

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ. Prof. Dr. Dr. h. c. E. Märtlbauer

Angefertigt am
Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit,
Dienststelle Oberschleißheim
(Dr. U. Busch)

**Etablierung einer Multiplex Real-Time PCR zum Nachweis der
Escherichia coli-Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Hannah Adam
aus
Tübingen

München 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin Märtlbauer

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Petra Kölle

Tag der Promotion: 20. Juli 2013

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
I. EINLEITUNG	1
II. LITERATUR	3
2.1 <i>Escherichia coli</i> – Taxonomie und Charakterisierung	3
2.2 Pathogene <i>E. coli</i>	7
2.3 STEC und EHEC	8
2.3.1 Pathogenitätsfaktoren und –mechanismus von STEC	10
2.3.1.1 Shigatoxine – Aufbau und Funktion	10
2.3.1.2 Intimin	13
2.3.1.3 Enterohämolysin	15
2.4 Serovaren Shigatoxin-produzierender <i>E. coli</i>	17
2.4.1 Bedeutende STEC/EHEC-Serovaren beim Menschen	17
2.4.1.1 Pathogenitätsfaktoren bedeutender <i>E. coli</i> -Serovaren	19
2.4.1.2 EHEC O104:H4 – ein Ausnahmefall	23
2.4.2 Humanvirulente STEC in Lebensmitteln und Wasser	25
2.4.3 Humanvirulente STEC beim Tier	27
2.5 Rechtliche Grundlagen zu STEC und das Meldewesen	28
2.6 Molekularbiologischer <i>E. coli</i> -Serogruppennachweis	30
III. MATERIAL UND METHODEN	32
3.1 Probenmaterial und Probenbearbeitung	32
3.2 Serotypisierung	33
3.3 Lagerung und Aufbereitung von Isolaten (Stammhaltung)	35
3.4 Bakterienstämme	35
3.4.1 STEC-Referenzstämme	35
3.4.2 Bakterienstämme zur Selektivitätsbestimmung	36
3.4.2.1 Inklusivitätsbestimmung	36
3.4.2.2 Exklusivitätsbestimmung	36
3.5 <i>Stx</i> -negative humane Stuhlproben	36
3.6 Molekularbiologische Methoden	37
3.6.1 Extraktion von Referenz-DNA aus bakteriellen Reinkulturen	37
3.6.2 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung	38
3.6.3 Etablierung der Real-Time PCR zum Nachweis der <i>E. coli</i> - Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157	39
3.6.3.1 SONDASystem	40
3.6.3.2 Kontrollen	43
3.6.3.3 Singleplex PCR-Systeme	43
3.6.3.4 Pentaplex PCR-System	44
3.6.3.5 Sensitivität	44
3.6.3.5.1 Dezimale Verdünnungsreihen in Thymus-DNA-Lösung	45
3.6.3.5.2 Bestimmung der Nachweisgrenzen	46
3.7 Datenauswertung und Statistik	48
IV. ERGEBNISSE	49
4.1 Vergleichende Auswertung der Untersuchungsdaten	49
4.1.1 Humane Proben	49
4.1.2 Lebensmittel- und Schlachtkörperproben	55
4.1.3 Wasserproben	57
4.1.4 Tierkotproben	59

4.2	Verteilung der Serovaren untersuchter EHEC/STEC-Stämme.....	60
4.2.1	Humane Proben.....	61
4.2.1.1	HUSEC-Stammabgleich (2009 bis 2011).....	62
4.2.2	Lebensmittel- und Schlachtkörperproben.....	63
4.2.3	Wasserproben	63
4.2.4	Tierkotproben	64
4.3	Etablierung der qualitativen Real-Time PCR-Systeme.....	64
	(EcS-PCR)	64
4.3.1	Selektivität	64
4.3.1.1	Inklusivität.....	64
4.3.1.2	Exklusivität	65
4.3.1.2.1	<i>Enterobacteriaceae</i> -Stämme	65
4.3.1.2.2	<i>E. coli</i> -Stämme anderer Serogruppen.....	65
4.3.2	Sensitivität	67
4.3.3	Präzision und Richtigkeit.....	69
4.3.4	Serogruppen-Nachweis in <i>stx</i> -negativen Stuhlproben-.....	69
	Mischkulturen	69
V	DISKUSSION	71
5.1	Vergleichende Auswertung der EHEC / STEC-Proben	71
	2009 bis 2011 in Bayern und Serotypisierungsergebnisse	71
5.1.1	Humane EHEC-Proben.....	71
5.1.2	Vorkommen von STEC in Lebensmitteln, Wasser, Schlachtkörpern und Tierkot 2009 bis 2011	76
5.2	STEC O26, O103, O111, O145 und O157 in der Diagnostik	80
5.2.1	Serologischer und molekularbiologischer <i>E. coli</i> Serogruppen- Nachweis.....	82
5.2.2	Real-Time PCR-Systeme.....	83
5.2.2.1	<i>E. coli</i> O103-Sonde	83
5.2.2.2	Validierung der Real-Time PCR-Systeme.....	84
5.2.2.2.1	Selektivität	84
5.2.2.2.2	Sensitivität, Richtigkeit und Präzision	85
5.2.2.2.3	Kontrollen	87
5.3	<i>Stx</i> -negative Mischkulturen	87
5.4	Schlussfolgerung.....	89
VI	ZUSAMMENFASSUNG.....	90
VII	SUMMARY	92
VIII	ANHANG	94
8.1	Material und Methoden.....	94
8.1.1	Geräte	94
8.1.2	Verbrauchsmaterialien	94
8.1.3	Nährmedien	95
8.1.4	Reagenzien und Lösungen	96
8.2	Ergebnisse	98
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	123
	TABELLENVERZEICHNIS	124
	LITERATURVERZEICHNIS.....	125
	RECHTSVERZEICHNIS.....	146
	VERÖFFENTLICHUNGEN	147
	DANKSAGUNG	148

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A/E	attaching and effacing
A ₂₆₀	Absorptionswert bei einer Wellenlänge von 260 nm
AAF	aggregative adherent fimbriae
aEHEC	aggregative EHEC
AVV	Allgemeine Verwaltungsvorschrift
BayBadeGewV	Bayerische Badegewässerverordnung
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bp	Basenpaar(e)
c	Konzentration
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
C _t	Cycle threshold
DAEC	diffuse adherent <i>E. coli</i>
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DSM(Z)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (und Zellkulturen)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>eae</i>	<i>E. coli attaching and effacing</i> , Intimin-kodierendes Gen
EAHEC	entero-aggregative-haemorrhagic <i>E. coli</i>
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
ECODAB	<i>Escherichia coli</i> O-antigen Database
EcS-PCR	<i>E. coli</i> -Serogruppen-PCR; Real-Time PCR zum Nachweis der <i>E. coli</i> Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157
EFSA	European Food Safety Authority
EHEC	enterohemorrhagic <i>E. coli</i>
<i>EhlyA</i>	Enterohämolysin-kodierendes Gen
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	enteropathogenic <i>E. coli</i>
ESBL	Extended-Spektrum Beta-Laktamase
ETEC	enterotoxigenic <i>E. coli</i>
ExPEC	extraintestinale pathogene <i>E. coli</i>
F-Antigen	Fimbrienantigen, fimbrial antigen
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
Gb3, Gb4	Globotriaosylceramid, Globotetraosylceramid
GDPMH	GDP-mannose mannosyl hydrolase
GN-Bouillon	Gramnegativen-Bouillon
Guanidin-HCl	Guanidinhydrochlorid
H- / NM	H non-motile, kein H-Antigen vorhanden
H-Antigen	Geißelantigen, flagellar antigen
Hnt	H non-typeable, nicht typisierbares H-Antigen
HUS	Hämolytisch-Urämisches Syndrom
HUSEC	HUS-assoziierte <i>E. coli</i>
IfSG	Infektionsschutzgesetz
InPEC	intestinale pathogene <i>E. coli</i>
ISO	International Organization for Standardization
k. A.	keine Angaben
K-Antigen	Kapselantigen, capsular antigen
KbE	koloniebildende Einheit
KS	Keimsuche

LEE	Locus of Enterocyte Effacement
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LOD	Limit of Detection, Nachweisgrenze
LPS	Lipopolysaccharid
LT	heat-labile toxin
MAC	membrane attack complex
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight-Mass Spectrometry
Mb	Megabase = 10^6 Basen
MK	Mischkultur
mTSB	modifizierte Tryptose-Soja-Bouillon
n	Anzahl
NMEC	neonatal meningitis <i>E. coli</i>
NRL	Nationales Referenzlabor
NRZ	Nationales Referenzzentrum
O-Antigen	Oberflächenantigen, somatic antigen
OD	Optische Dichte
Ont	O non-typeable, nicht typisierbares O-Antigen
Orf	O rough, raues O-Antigen
PCR	polymerase chain reaction; Polymerasekettenreaktion
PMN	polymorphonuclear leukocytes
RK	Reinkultur
RKI	Robert Koch-Institut
R-LPS	rough LPS
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RTPECs	renal proximal tubule epithelial cells
S-LPS	smooth LPS
sp., spp.	Spezies (Einzahl, Mehrzahl)
ST	heat-stable toxin
STEC	Shigatoxin-producing <i>E. coli</i>
STEC-Ref.-DNA	DNA der STEC-Referenzstämme
Stx	Shigatoxin
stx	Shigatoxin-kodierendes Gen
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
TierSG	Tierseuchengesetz
Tir	translocated intimin receptor
TrinkwV	Trinkwasserverordnung
UBA	Umweltbundesamt
UPEC	uropathogenic <i>E. coli</i>
USDA	U.S. Department of Agriculture
V	Verdünnungsstufe
VO	Verordnung
VTEC	Verocytotoxin-producing <i>E. coli</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

I. EINLEITUNG

Shigatoxin-bildende *Escherichia coli* (STEC) bzw. enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) sind wichtige, lebensmittelassoziierte Erkrankungserreger beim Menschen. Jährlich werden in Deutschland rund 1000 humane EHEC-Infektionen dokumentiert (RKI 2012b, Daten der Jahre 2001 bis 2010). Die meisten dieser Erkrankungen weisen eine gute Prognose auf. Es kann jedoch insbesondere bei Kindern in 5 bis 15 % der Fälle zu einer Generalisierung der Infektion kommen (WADL et al. 2010). Damit einher gehen postinfektiöse Komplikationen, wie das Hämolytisch-Urämische Syndrom (HUS), welche mitunter lebenslange Folgeschäden für die Betroffenen nach sich ziehen. Als Hauptquelle für humane EHEC-Infektionen gelten nicht ausreichend durcherhitzte Lebensmittel wie z. B. Fleisch und Rohmilch von Wiederkäuern, denn der Gastrointestinaltrakt dieser Tiere stellt das primäre Habitat von STEC dar.

Verschiedene Studien hierzu zeigen, dass nicht alle STEC-Stämme die gleiche Virulenz für den Menschen aufweisen und dass neben den lange bekannten STEC O157 auch solche der Serogruppen O26, O103, O111 und O145 besonders häufig bei schweren humanen Erkrankungsverläufen auftreten (KARMALI et al. 2003a; ECDC/EFSA 2011; USDA 2012a). Die *International Organization for Standardization* (ISO) veröffentlichte 2012 die Norm ISO/TS 13136:2012, welche den qualitativen Real-Time PCR-Nachweis von STEC aus Lebensmitteln und deren Beurteilung beschreibt. *Eae*-positive STEC der oben genannten Serogruppen werden demnach als „hochpathogen“ für den Menschen beurteilt. Im Jahr 2011 rückte mit Ausbruch des EHEC O104:H4 zudem eine hochvirulente, aber bisher kaum bekannte Seroovar in den Mittelpunkt des öffentlichen Interesses. In diesem Zusammenhang wird eine über den Shigatoxin-Nachweis hinausgehende Differenzierung in der STEC-Diagnostik angestrebt, wobei die Serotypisierung von STEC-Stämmen nicht nur für epidemiologische Zwecke, sondern auch zur Beurteilung der STEC-Virulenz genutzt werden kann.

EINLEITUNG

Ziel dieser Studie war es zum einen, die Serogruppendiagnostik für die Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157 am *Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit* (LGL), Oberschleißheim, einzuführen und für einen Einsatz in der Routinediagnostik zu testen. Hierzu wurden Real-Time PCR-Verfahren zum Nachweis der fünf genannten STEC-Serogruppen etabliert. Zum anderen sollte die aktuelle Lage in Bezug auf humane STEC-Infektionen in Bayern, STEC-Kontaminationen südbayerischer Lebensmittel und eingesandter Schlachtkörper- bzw. Wasserproben sowie das STEC-Vorkommen in Tierkotproben ermittelt werden. Hierfür wurden die Untersuchungsdaten aus den Jahren 2009 bis 2011 und die Serotypisierungsergebnisse von Isolaten des Zeitraums 09/2004 bis 12/2011 zusammengefasst und diskutiert.

II. LITERATUR

2.1 *Escherichia coli* – Taxonomie und Charakterisierung

Domäne:		<i>Bacteria</i>
Stamm:	XIV.	<i>Proteobacteria</i>
Klasse:	III.	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordnung:	XIII.	<i>Enterobacteriales</i>
Familie:	I.	<i>Enterobacteriaceae</i>
Gattung:	I.	<i>Escherichia</i>
Art:		<i>Escherichia coli</i>

(BMSB 2005).

Als ursprünglich gewöhnlicher Darmkommensale von Warmblütern und ubiquitäres Bakterium gehört *Escherichia coli* (*E. coli*) heute zu den am besten erforschten Mikroorganismen in der Mikro- und Molekularbiologie (DOBRINDT 2007). Erstmals von Theodor ESCHERICH (1885) als *Bacterium coli commune* beschrieben, wurde es später unter der Bezeichnung *Escherichia coli* durch CASTELLANI und CHALMERS (1919) in die bakteriologische Systematik aufgenommen. Bakterien der Spezies *E. coli* gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae* und sind dementsprechend Gram-negative, fakultativ anaerobe sowie Katalase-positive und Oxidase-negative Stäbchenbakterien, die in ihrem natürlichen Habitat, dem Gastrointestinaltrakt von Warmblütern, annähernd ein Prozent der bakteriellen Darmflora ausmachen (SUERBAUM et al. 2009). Aufgrund dessen werden *E. coli* auch als Indikatorkeime für fäkale Kontaminationen von Trinkwasser genutzt (TrinkwV). Ein weiteres, biochemisches Merkmal der meisten *E. coli* ist die säureproduzierende Fermentation von beispielsweise Lactose, Mannit oder Sorbit, wobei die Serogruppe O157 hierbei eine Ausnahme darstellt: nur einige Stämme der Serovar O157:H- können Sorbit fermentieren (SCHEUTZ und STROCKBINE 2005; FRIEDRICH et al. 2007). In der Regel sind *E. coli* beweglich aufgrund einer peritrichen Begeißelung aus fünf bis zehn Geißeln und weisen eine hohe Säuretoleranz auf (LARGE et al. 2005; WEBER 2010). Eine starke Anpassungsfähigkeit ist nötig, da sie sowohl im Darmtrakt von Mensch und Tier als auch – nach Ausscheidung – für einige Zeit in der Umwelt überleben können. Sie sind in der Lage ihren

Metabolismus binnen Kurzem auf neue Habitate einzustellen und benötigen dazu nur wenige Hundert Generationswechsel (SABARLY et al. 2011). Die Generationszeit liegt unter optimalen Bedingungen (ausreichendes Nährstoffangebot, 37 °C) bei rund 20 Minuten und steigt mit sinkender Umgebungstemperatur, wobei eine Vermehrung von *E. coli* bis zu einer Temperatur von lediglich 6 °C bei einer Generationszeit von über 69 Stunden nachgewiesen wurde (LUDEWIG und FEHLHABER 2009).

Der Zellwandaufbau von *E. coli* ermöglicht zusätzlich eine serologische Subdifferenzierung unterschiedlicher Stämme. Das Vorkommen von verschiedenen *E. coli*-Antigenen wurde erstmals von KAUFFMANN und VAHLNE (1945) beschrieben. Dabei wurden in Anlehnung an das Kauffmann-White-Schema zur Salmonellensubtypisierung die O-, H- und K-Antigene von *E. coli* bestimmt. Im Lauf der Zeit wurde dieses Serotypisierungsschema ergänzt und erweitert, so dass aktuell vier *E. coli*-Antigenstrukturen unterschieden werden: O-, H-, K- und F-Antigene.

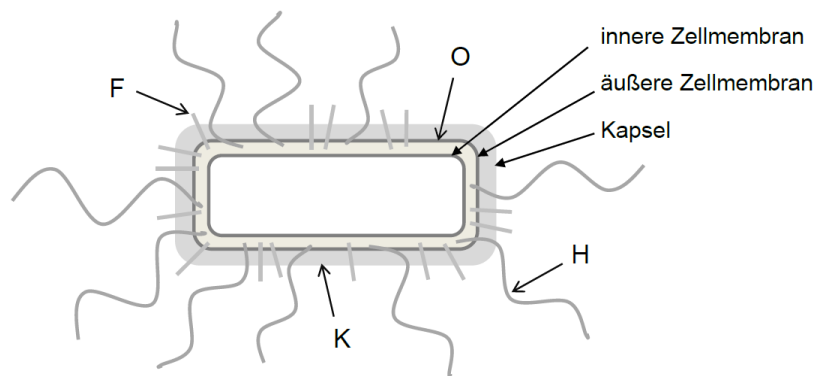


Abb. 2.1: *E. coli*-Antigene modifiziert nach QUINN et al. (2011)

Das thermostabile Oberflächenantigen (**O-Antigen**; somatic antigen) ist Bestandteil des Lipopolysaccharids (LPS) der äußeren, bakteriellen Zellmembran. Lipopolysaccharide erfüllen verschiedene Funktionen: zum einen stabilisieren sie die äußere Zellmembran und bilden eine Barriere gegen das Eindringen bakterizid wirkender Stoffe wie Antibiotika oder Detergentien, zum anderen spielen sie eine wichtige Rolle in Bezug auf die Virulenz von *E. coli* und dienen der Adhäsion sowie Kolonisation; bis zu drei Viertel der äußeren Zellmembran von Gram-negativen Bakterien ist mit Lipopolysacchariden bedeckt (SILIPO und MOLINARO 2011).

Das LPS selbst besteht aus drei Einheiten: dem Lipid A, welches in der äußeren Zellmembran verankert ist, einem Oligosaccharid-Anteil (Core Region) und einer variablen, O-Antigen-spezifischen Polysaccharidkette am äußeren Ende, dem O-Antigen (FORSYTHE 2010). Lipid A wirkt toxisch, wenn es nach Zerstörung der bakteriellen Zellwand freigesetzt wird und kann beim Wirt in hohen Konzentrationen zu einem septischen Schock führen (CHRISTIE 2011).

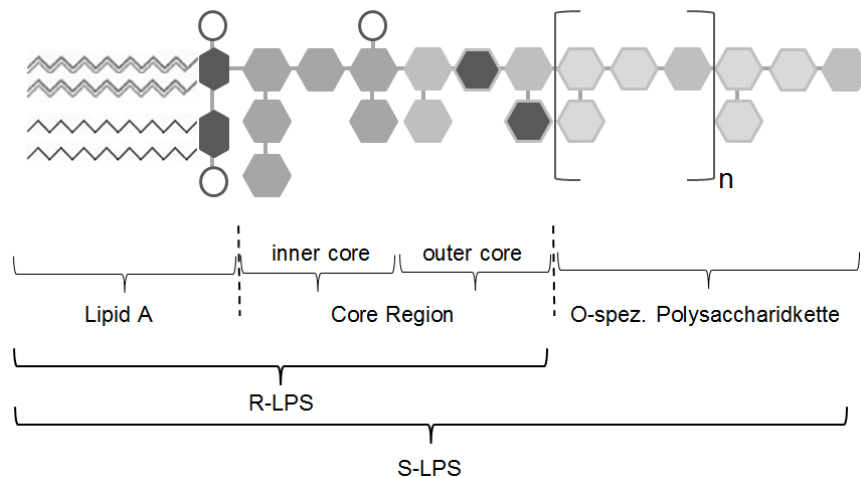


Abb. 2.2: LPS von *E. coli* - modifiziert nach SILIPO und MOLINARO (2011)

Das O-Antigen des LPS ist ein Polymer aus sich wiederholenden Oligosaccharideinheiten; ist es vorhanden spricht man von einem S-LPS (smooth), fehlt es, so handelt es sich um ein R-LPS (rough; SILIPO und MOLINARO 2011). Die Struktur des **S-LPS** ermöglicht es Bakterienstämmen, dem Zugriff durch das Immunsystem des Wirtsorganismus zu entkommen, denn eine Bindung des MAC (membrane attack complex) an die bakterielle äußere Membran wird durch hydrophile Polysaccharidketten des S-LPS erschwert (WANG et al. 2000a). Der fehlende Phagozytoseschutz ist auch der Grund, weshalb R-LPS-tragende Stämme meist nicht virulent sind (VALENTIN-WEIGAND 2011). MIYASHITA et al. (2012) wiesen zudem eine protektive Wirkung des LPS aus EHEC O157:H7-Stämmen gegenüber antimikrobiellen Peptiden der angeborenen Immunantwort von Wirtstieren nach.

Lipopolysaccharide von Gram-negativen Bakterien wie *E. coli* stellen also einen wichtigen Schutz gegenüber dem Immunsystems des Wirtsorganismus dar.

Das thermolabile Geißelprotein Flagellin oder **H-Antigen** (flagellar antigen) wurde ursprünglich nach dem „Hauch“ benannt, den schwärmende Bakterienspezies auf Nähragarplatten abbilden (WIELER et al. 2011a). Ungefähr 20000 dieser um die 55 kDa großen Proteine bilden gemeinsam eine α -helikal geformte *E. coli*-Geißel, welche der bakteriellen Fortbewegung dient (AIZAWA 2009). Die Vielfalt an H-Antigenen entsteht aufgrund der variablen Aminosäuresequenz im Mittelteil der Flagellin-primärstruktur; die terminalen Enden, an denen sich die Flagellineinheiten zusammensetzen, sind hingegen konserviert (SCHAECHTER 2009).

Manche *E. coli*-Stämme exprimieren zusätzlich thermolabile oder thermostabile Kapselantigen (**K-Antigene**, capsular antigen). In der Regel sind es Polysaccharide, die als zusätzliche Hülle fest der äußeren Zellmembran angelagert sind (WHITFIELD 2006). Solche Kapseln dienen dem Schutz der Bakterien vor Phagozytose und Komplement-mediierter Zellyse und sind ein wichtiger Pathogenitätsfaktor bei intrazellulären, persistierenden *E. coli*-Infektionen (GOLLER und SEED 2010). Diagnostisch betrachtet können O-Antigene von einer Kapsel überdeckt und somit im Agglutinationsnachweis verschleiert werden, weshalb hier eine vorherige Hitzedenaturierung der Kapsel notwendig ist (WHITFIELD und ROBERTA 1999). Kurze, fibrilläre oder helikal geformte Fimbrien der bakteriellen Zelloberfläche dienen der Adhäsion von *E. coli* an Wirtsepithelien. Die aus Proteinuntereinheiten - dem Fimbrienantigen (**F-Antigen**, fimbrial antigen) – aufgebauten Fimbrien sind oftmals wirts- oder gewebespezifisch und haben keine einheitliche Nomenklatur; so kommt es mitunter zu Doppelbenennungen, wie bei den ursprünglich als proteinhaltige K-Antigene K88 und K99 bezeichneten F-Antigenen F4 und F5 (ORSKOV et al. 1977; REMAUT und WAKSMAN 2009; GYLES und FAIRBROTHER 2010).

Aktuell sind 174 O-Antigene (O1 bis O181, wobei die O-Antigene O31, O47, O67, O72, O93 und O94 nachträglich wieder entfernt wurden), 53 H-Antigene (H1 bis H56, wobei H13, H22 und H50 entfernt wurden), 80 K-Antigene sowie rund 30 Fimbrientypen bekannt (SUERBAUM et al. 2009; GYLES und FAIRBROTHER 2010; ECODAB 2012).

2.2 Pathogene *E. coli*

Grundsätzlich lassen sich apathogene und pathogene Stämme von *E. coli* unterscheiden. Pathogene *E. coli* wiederum werden anhand ihrer Pathogenitätsfaktoren und der Lokalisation im Wirt in verschiedene Pathovaren unterteilt. Die kodierenden Virulenzgene werden entweder als chromosomale Pathogenitätsinseln des Genoms bei der Bakterienzellteilung weitergegeben oder können als Teil von mobilen Pathogenitätsinseln, Plasmiden, Transposonen oder Bakteriophagen direkt von Bakterium zu Bakterium transferiert werden (KIRSCH et al. 2004; CROXEN und FINLAY 2010; SCHLAGER 2011). Ausgehend vom Menschen als Wirtsorganismus wird zwischen obligat pathogenen, intestinalen und fakultativ pathogenen, extraintestinalen *E. coli* differenziert, kurz gesagt zwischen InPEC und ExPEC (MORIEL et al. 2012; ULLMANN 2012).

Die wichtigsten Vertreter der ExPEC sind **UPEC** (uropathogenic *E. coli*), verantwortlich für rund 80 % der Harnwegsinfekte beim Menschen, und **NMEC** (neonatal meningitis *E. coli*), welche nach Überwinden der Darmbarriere und der Blut-Hirn-Schranke schwere Meningitiden bei Neugeborenen auslösen (CROXEN und FINLAY 2010).

Die Gruppe der darmpathogenen *E. coli* beinhaltet sechs Pathovaren: **STEC** (Shiga Toxin producing *E. coli*; siehe folgenden Abschnitt 2.3). **EPEC** (enteropathogenic *E. coli*) verursachen teilweise lebensgefährliche Durchfälle bei Säuglingen und Kleinkindern. Die kodierenden Gene für das hierbei maßgebliche Protein Intimin liegen als Pathogenitätsinsel (Locus of Enterocyte Effacement, LEE) vor und sind homolog auch in STEC-Stämmen zu finden (HERNANDES et al. 2009; CROXEN und FINLAY 2010). **ETEC** (enterotoxigenic *E. coli*) sind Auslöser wässriger Diarrhoe vor allem bei Kindern in Entwicklungsländern bzw. der „Reise-Diarrhoe“ bei Reisenden. Hauptpathogenitätsfaktoren sind die nach einer Besiedlung des Dünndarms freigesetzten Enterotoxine (LT und/oder ST), welche die H₂O-Sekretion in das Darmlumen steigern (AL-ABRI et al. 2005; CROXEN und FINLAY 2010). **EIEC** (enteroinvasive *E. coli*) können die Ursache von wässrigen Durchfällen bis hin zu einer entzündlichen

Colitis sein. Sie dringen in Kolonepithelzellen ein und vermehren sich intrazellulär. Eine Generalisierung der Infektion ist aber selten (KAPER et al. 2004; CROXEN und FINLAY 2010). Verschiedene Entero- und Cytotoxine wurden bei **EAEC** (entero-aggregative *E. coli*) nachgewiesen (z. B. ShET1, EAST1, SPTAN1), sie verursachen teils persistierende Durchfälle und sind in Industrie- sowie Entwicklungsländern verbreitet (CROXEN und FINLAY 2010). **DAEC** (diffuse adherent *E. coli*) können Durchfälle bei Kleinkindern und Harnwegsinfekte bei Erwachsenen auslösen. Adhäsine der DAEC binden an das Dünndarmepithel des Wirts, was zu einer Elongation und letztendlich Zerstörung der Bürstensaummembran führt (CROXEN und FINLAY 2010; SCHLAGER 2011).

2.3 STEC und EHEC

Shigatoxin-produzierende *E. coli* (STEC synonym VTEC, Verocytotoxin-producing *E. coli*) sind *E. coli* mit der Fähigkeit zur Shigatoxinsynthese. Zur Gruppe der **STEC** gehören auch **EHEC**, enterohämorrhagische *E. coli*, welche bei infizierten Menschen zu schwerwiegenden klinischen Symptomen führen können. *Stx*-positive *E. coli*-Stämme aus klinisch erkrankten Menschen werden als EHEC, solche anderer Herkunft als STEC bezeichnet (BfR 2012a). Dabei reicht die Spannweite der möglichen Erkrankungsverläufe von Asymptomatik über wässrige Diarrhoe bis hin zur Hämorrhagischen Colitis. Vor allem Kinder und seltener auch ältere Patienten können postinfektiös das enteropathische Hämolytisch-Urämische Syndrom (HUS) entwickeln, bei dem es, begründet durch eine generalisierte Shigatoxinverbreitung, zu akuter Niereninsuffizienz, mikroangiopathischer hämolytischer Anämie, Thrombozytopenie und gegebenenfalls zu Schädigungen des ZNS kommen kann (BOYER und NIAUDET 2011; GOULD und JORDAN 2011). BIELASZEWSKA et al. (2007a) berichten von häufig auftretenden Langzeitschäden unter anderem der Nierenfunktion betroffener Patienten. Zudem liegt die Letalität von an HUS erkrankten Kindern bei annähernd 5 % (OAKES et al. 2006).

Shigatoxin-produzierende *E. coli* sind Darmkommensalen bei Nutz- und Wildwiederkäuern, welche als Reservoirwirte dienen und in der Regel

keine klinische Symptomatik zeigen (KARCH et al. 2009; FLI 2012a). Die Zellzahl in Rinderfäzes beträgt dabei bis zu 10^7 KbE/g (WEBER 2010). In Wasser und Lebensmitteln (z. B. Käse) können STEC einige Wochen überleben (GROHMANN et al. 2011). Eine Übertragung auf den Menschen erfolgt durch kontaminierte Lebensmittel, kontaminiertes Wasser bzw. durch direkten, fäkal-oralen Kontakt zu infizierten Menschen oder Tieren (Zoonose). Dabei ist die Infektionsdosis mit zehn bis 100 Keimen bei manchen STEC auch im Vergleich zu anderen *E. coli*-Pathovaren äußerst gering; zusätzlich ermöglicht die bereits erwähnte Säuretoleranz von *E. coli* eine unversehrte Magen- und Dünndarm-passage der Keime (GROHMANN et al. 2011; FLI 2012a). Im Gegensatz zur Erhitzung (mindestens 72 °C für 2 Minuten) dezimieren höhere Salzkonzentrationen oder das Reifen und Trocknen von Lebensmitteln die Keimzahl oft nicht ausreichend (BfR 2011a).

Das genetische Potenzial von STEC ist - wie bei allen *E. coli* - enorm. Das Genom pathogener *E. coli* beinhaltet in der Regel rund 5000 verschiedene Gene, wobei das Core-Genom - der Anteil des Genoms, der allen *E. coli* gemein ist - aus ca. 2200 Genen besteht, was bedeutet, dass über die Hälfte der Gene eines Stammes variabel sind (RASKO et al. (2008); TOUCHON et al. (2009) berichten von 2000 Genen im Core-Genom). Die kodierenden Gene sind auf ein zirkuläres Chromosom sowie meist ein oder mehrere Plasmide verteilt (PERNA 2011). Mobile genetische Elemente (Plasmide, Transposonen, Bakteriophagen und Pathogenitätsinseln) dienen hierbei dem Austausch und der Verbreitung von Pathogenitäts- und Fitnessfaktoren via horizontalem Gentransfer (MORIEL et al. 2012). So erklärt sich auch, warum das Genom pathogener *E. coli* um rund 1000 Gene - bis zu 1 Mb - größer ist als das von apathogenen Stämmen; durch den Zugewinn sowie den Verlust von Virulenzgenen können kommensale *E. coli* zu pathogenen *E. coli* werden und umgekehrt (TOUCHON et al. 2009). Die genetische Plastizität begründet die starke Anpassungsfähigkeit von *E. coli* und spiegelt sich in der Entstehung neuer Varianten, wie dem EHEC-Ausbruchsstamm von 2011 wider (BRZUSZKIEWICZ et al. 2011; siehe auch Abschnitt 2.4.1.2).

2.3.1 Pathogenitätsfaktoren und –mechanismus von STEC

2.3.1.1 Shigatoxine – Aufbau und Funktion

Wie es der Name bereits impliziert sind Shigatoxine (Stx, auch Shiga-like Toxine oder Verozytotoxine) die Hauptpathogenitätsfaktoren von Shigatoxin-produzierenden *E. coli*. Erstmals wurden diese Exotoxine bei *Shigella (S.) dysenteriae* Serovar 1 nachgewiesen und es besteht eine enge Verwandtschaft zwischen den Shigatoxinen von *S. dysenteriae* Serovar 1 und denen aus Shigatoxin-produzierenden *E. coli* (SCHÜLLER 2011). Bei STEC lassen sich zwei Gruppen von Shigatoxinen unterscheiden: Stx1 stimmt bis auf wenige Aminosäuren seiner Sequenz mit dem Shigatoxin von *S. dysenteriae* Serovar 1 überein, dahingegen ist die Struktur von Stx2 lediglich zu rund 55 % homolog (ZHANG et al. 2002). Neben Stx1 wurden zusätzlich die Untergruppen Stx1a, Stx1c und Stx1d, bei Stx2 die Untergruppen Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2d_{act} (Elastase-aktivierbares Stx2d), Stx2e, Stx2f und Stx2g nachgewiesen; wobei diese Subtypen auch in ihrer Toxizität und Wirtsspezifität variieren (WEINSTEIN et al. 1988; SCHMITT et al. 1991; SCHMIDT et al. 2000; FRIEDRICH et al. 2002; MELTON-CELSA et al. 2002; ZHANG et al. 2002; BÜRK et al. 2003; LEUNG et al. 2003; SCHEUTZ et al. 2012).

Shigatoxine sind AB₅-Holotoxine, aufgebaut aus einer enzymatisch aktiven A-Untereinheit mit zwei Domänen (A₁ und A₂) und fünf B-Untereinheiten. Die ringförmig angeordneten B-Untereinheiten binden an den Wirtszellrezeptor Gb3 (Globotriaosylceramid), woraufhin das Toxin von der Wirtszelle endozytiert wird (JOHANNES und RÖMER 2010). Nach GALLEGOS et al. (2012) binden Stx1 und Stx2e zudem auch an das z. B. in Darmgeweben weit verbreitete Gb4 (Globotetraosylceramid). Der Gb3-Rezeptor ist jedoch die bevorzugte Bindungsstelle für Shigatoxine und findet sich beim Menschen vor allem in den Endothelien von Nephronen und in den Kapillarendothelien des Kolons sowie des zentralen Nervensystems (ZUMBRUN et al. 2010). Bisher wurde angenommen, dass Gb3 beim Menschen nicht auf gesundem Darmepithel anzutreffen ist, was Fragen bezüglich der Toxinaufnahme in die Darmzellen aufwarf (SCHÜLLER 2011). Erst vor Kurzem fanden ZUMBRUN et al. (2010)

Hinweise auf das Vorhandensein geringer Mengen Gb3-Rezeptoren – neben dem weit verbreiteten Gb4 - auf humanem Kolonepithel.

Intrazellulär gelangen Shigatoxine durch retrograden Transport über den Golgiapparat in das Endoplasmatische Retikulum, wobei die A-Untereinheit durch die Serinprotease Furin in zwei Domänen (A₁ und A₂) gespalten wird (TESH 2012). Ziel des nun aktivierten A₁-Anteils ist die

28S-rRNA der Wirtszelle. Hier spaltet er in seiner Funktion als *N*-Glycosidase einen Adeninrest ab (Depurinierung), was die Proteinbiosynthese der Zelle unterbindet; der genaue, nun folgende Ablauf ist *in vivo* nicht vollständig geklärt, letztlich führt die Beendigung der Proteinbiosynthese aber zur Auslösung einer ribotoxischen Stressantwort und schlussendlich zur Apoptose der Wirtszelle (SCHÜLLER 2011; TESH 2012). Zudem lösen Shigatoxine auch die Freisetzung von Zytokinen aus Monozyten und Makrophagen aus, was wiederum zu einer verstärkten Gb3-Expression auf der Zelloberfläche von Endothelzellen sowie zur Ausschüttung von endothelschädigenden reaktiven Sauerstoffradikalen aus Leukozyten führen kann (JOHANNES und RÖMER 2010). Die genaue Infektionsgeneralisierung aus dem

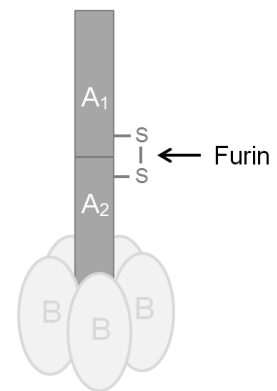


Abb. 2.3:
Aufbau des
Shigatoxins
modifiziert nach
SANDVIG et al.
(2010) mit einer
A- und fünf B-
Untereinheiten

Darmlumen heraus ist noch unklar, es wird aber nach dem Übertritt ins Darmepithel von einer hämatogenen, zellassozierten Verbreitung der Shigatoxine ausgegangen. So fanden BRIGOTTI et al. (2011) Stx im Blut von HUS-Patienten vorwiegend gebunden an PMN (polymorphonuclear leukocytes), während der Gehalt an freiem Stx im Blut gering und für die HUS-Symptomatik nicht relevant war. Schäden an den Endothelien des Kolons, der Niere und des ZNS sowie die darauf folgende Thrombusbildung führen dann zur typischen EHEC- bzw. HUS-Symptomatik (KAPER et al. 2004).

Shigatoxine sind phagenkodiert und werden in der Regel nicht während des normalen Zellzyklus von STEC produziert. Kommt es aber zu Schädigungen der DNA (deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure),

wird die bakterielle SOS-Antwort in STEC induziert. Die Einleitung der DNA-Reparatur aktiviert zeitgleich auch den Lysezyklus des Bakteriophagen, welcher die bislang gehemmten *stx*-Gene als späte Gene (late genes) trägt. Demzufolge setzt die *stx*-Genexpression also erst ein, wenn der bakterielle Wirt des Phagen in Gefahr gerät und mit der nun folgenden Auflösung der bakteriellen Zellwand aufgrund des phageninduzierten Lysezyklus kommt es dann auch zur Freisetzung der Shigatoxine (MAURO und KOUDELKA 2011). UV-Strahlung, Antibiotika, aber auch reaktive Sauerstoffradikale aus Leukozyten und neutrophilen Granulozyten des Wirts fungieren dabei als auslösende DNA-schädigende Agentien (MAURO und KOUDELKA 2011; SCHÜLLER 2011). Zudem ist auch eine spontane Aktivierung des phagenassoziierten Lysezyklus ohne äußere Stressoren möglich, wobei die Wahrscheinlichkeit hierfür von STEC-Stamm zu STEC-Stamm unterschiedlich ist (MELTON-CELSA et al. 2012). Die Stx1-Expression kann des Weiteren auch durch Änderungen des Eisengehalts in der Umgebung beeinflusst werden. Niedrige Eisenkonzentrationen induzieren die Stx1-Synthese, weshalb sie *in vivo* auf den distalen Dünndarm und das Kolon beschränkt bleibt (JOHANNES und RÖMER 2010). Da es hierbei aber nicht zu einer phageninduzierten Zelllyse kommt, verbleiben die Shigatoxine 1 bis zur Zerstörung der Zellwand größtenteils im periplasmatischen Raum des Bakteriums (SCHÜLLER 2011).

Obwohl Stx1 und Stx2 grundsätzlich den gleichen Pathogenitätsmechanismus aufweisen, bestehen doch wesentliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Toxizität. So wird Stx2 in mehr Fällen mit der schweren Komplikation HUS beim Menschen nachgewiesen als Stx1 (BOCKEMÜHL et al. 1997; FRIEDRICH et al. 2002; KÄPPELI et al. 2011; CHASE-TOPPING et al. 2012). In infizierten Mausmodellen war Stx2 vornehmlich im Nierengewebe zu finden. Stx1 hingegen zeigte eine hohe Affinität zu Gb3-Rezeptoren im Lungengewebe. Da es hier zu keiner klinischen Symptomatik kommt, könnte die Rezeptorbindung in der Lunge eine Art apathogenes Sammelbecken für Stx1 darstellen und somit ein Grund für die verminderte Toxizität sein (LINGWOOD et al. 2009). Ein weiterer, möglicher Aspekt ist die Bindung von Stx1 an die im Darmepithel häufig

vorkommenden Gb4-Rezeptoren, was ZUMBRUN et al. (2010) zufolge keine toxischen Auswirkungen auf den Wirtsorganismus hat. LOWE et al. (2009) zeigten, dass sich in Anwesenheit von Stx2 die Kolonisation von STEC O157:H7 in bovinem Darmgewebe steigert. Außerdem ist die Zytotoxizität von Stx2 gegenüber renalen Endothelzellen 1000-fach höher als die von Stx1 und auch bei den verschiedenen Stx2-Varianten lassen unterschiedliche Toxizitätsgrade feststellen: in Verbindung mit schweren Krankheitsverläufen wie HUS finden sich vorwiegend die Genvarianten *stx2a*, *stx2c*, *stx2d* und *stx2d_{act}* (FRIEDRICH et al. 2002; BIELASZEWSKA et al. 2006; PERSSON et al. 2007; DE SABLET et al. 2008).

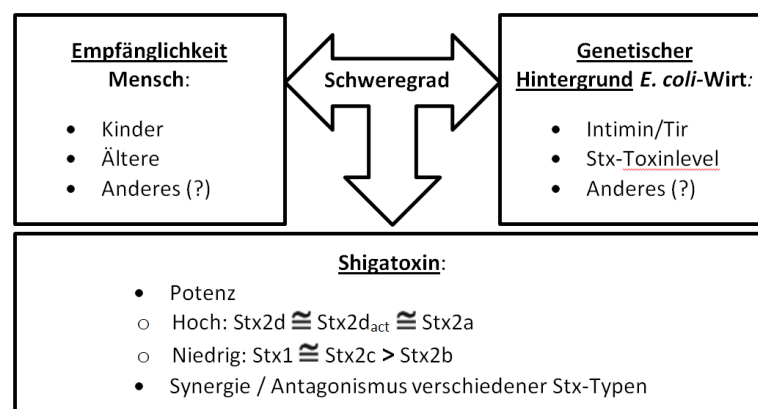


Abb. 2.4: Einfluss verschiedener Faktoren auf die Humanvirulenz von STEC modifiziert nach FULLER et al. (2011). Die toxische Wirkstärke (Potenz) von Stx2d, Stx2d_{act} und Stx2a ist in dieser Studie gegenüber Zellkulturen (humane RPTECs, Vero-Zellen) und *in vivo* (Maus) ähnlich hoch, während die von Stx1, Stx2c und Stx2b niedriger eingestuft wird. Stx2b war zudem weniger potent als Stx1 und Stx2c.

2.1.3.2 Intimin

Ein weiterer, wichtiger und weit verbreiteter Virulenzfaktor von STEC-Stämmen ist das Intimin, ein outer membrane adherence protein, chromosomal kodiert durch das *eae*-Gen (JERSE et al. 1990). Ein nachweisbares *eae*-Gen bei fehlendem *stx*-Gen ist charakteristisch für EPEC (siehe auch Abschnitt 2.2). Das *eae*-Gen ist Bestandteil der LEE-Pathogenitätsinsel (Locus of Enterocyte Effacement), welche zudem noch Gene für den Rezeptor Tir (translocated intimin receptor), ein Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) und verschiedene Effektorproteine (u. a. EspG, F, H und Map) trägt (MELTON-CELSA et al. 2012). Das Zusammenspiel dieser Komponenten ermöglicht es LEE-tragenden Bakterien

A/E (attaching and effacing)-Läsionen am Darmepithel des Wirts zu verursachen. Dabei werden die Effektorproteine mit Hilfe des T3SS in Enterozyten injiziert, wo sie Einfluss auf deren Zytoskelett und die zellulären Signalwege nehmen. Der ebenfalls injizierte Tir verankert sich in der Zytoplasmamembran der Wirtszelle und sorgt damit bei Intimin-Bindung für eine besonders enge Anheftung des Bakteriums an das Darmepithel. Dieser Mechanismus ist von EPEC-Infektionen bekannt. STEC-Stämme benötigen im Gegensatz zu EPEC-Stämmen noch ein weiteres, aber nicht LEE-kodiertes Effektorprotein, das EspF_u (*E. coli* secreted F-like protein from prophage U oder TccP, Tir-cytoskeleton coupling protein; JENKINS et al. 2008). EspF_u wird ebenfalls über das T3SS in die Wirtszelle injiziert. Letzten Endes führen all diese Komponenten gemeinsam zu einer Zerstörung der lokalen Mikrovilli und im Bereich der Bakterienadhäsion zur Ausbildung von Zellausstülpungen durch Aktinpolymerisation (SCHMIDT 2010; STRADAL und BACKERT 2010).

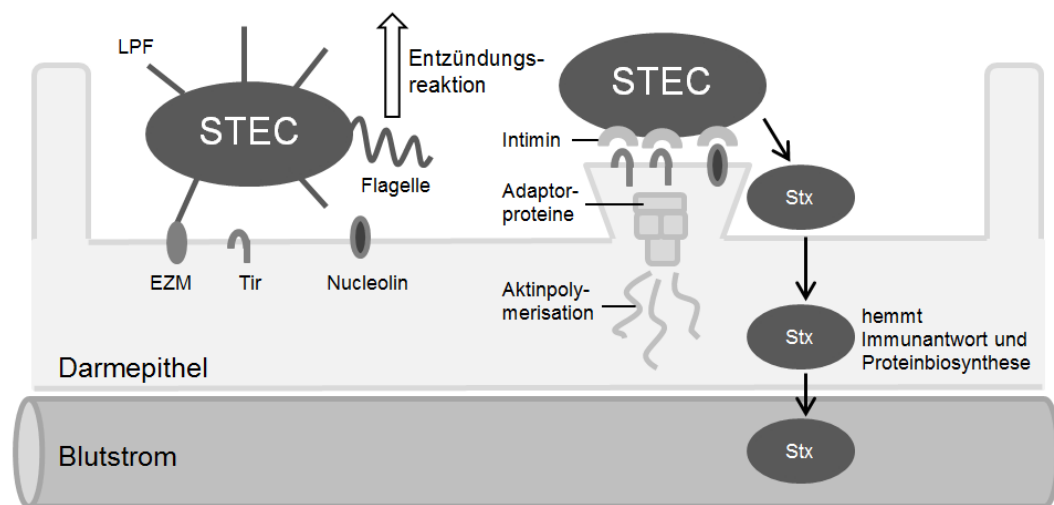


Abb. 2.5: STEC-Kolonisation im menschlichen Darm modifiziert nach FARFAN und TORRES (2011). Dargestellt sind die bakterielle Adhäsion mittels LPF (long polar fimbriae) an extrazelluläre Matrixproteine (EZM; z. B. Fibronectin, Laminin, Collagen IV), die Bildung Intimin-vermittelter A/E-Läsionen und die Stx-Aufnahme in den Blutkreislauf.

2.3.1.3 Enterohämolysin

Das plasmidkodierte *EhlyA* ist neben *stx1*, *stx2* und *eae* das vierte Virulenzgen, das in der molekularbiologischen EHEC/STEC-Diagnostik von Bedeutung ist. *EhlyA* kodiert mitsamt den Genen *EhlyB*, *EhlyC* und *EhlyD* das 107 kDa große, porenbildende RTX (repeats in toxin)-Zytolysin Enterohämolysin, auch EHEC-Hämolysin, EHEC-Hly, Ehly oder Ehx genannt (BAUER und WELCH 1996; ALDICK et al. 2009). Dieses Toxin verursacht Läsionen an Kapillarendothelien, Erythrozytenlyse bei verschiedenen Spezies sowie die Lyse boviner Lymphozyten (BROCKMEYER et al. 2011). Obwohl Enterohämolysin häufig bei STEC-Stämmen hoher Virulenz zu finden ist, wurde die genaue Funktion des Toxins noch nicht vollkommen ergründet (BROCKMEYER et al. 2011; YAN et al. 2012).

Neben den oben genannten Pathogenitätsfaktoren, dem LPS, den Flagellen und Fimbrien von *E. coli* gibt es noch eine Vielzahl weiterer, potenzieller Pathogenitätsfaktoren. Einige davon sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tab. 2.1: Weitere potenzielle Pathogenitätsfaktoren von STEC / EHEC,
modifiziert und ergänzt nach KAPER et al. (2004), MELTON-CELSA et al. (2012) und WONG et al. (2011)

Toxine	Bezeichnung, Bemerkung	Zielstruktur	Funktion
CDT	cytolethal distending toxin, ABC-Toxin / Cyclomodulin	DNA	DNase-I-Aktivität: Blockiert Mitose in der G2/M-Phase des Zellzyklus
Cif	Cycle-inhibiting factor, Typ-III-Effektor / Cyclomodulin	Nukleus	Blockiert Mitose in G2/M-Phase
EAST	enteroaggregatives <i>E. coli</i> heat-stable enterotoxin	Guanylatcyclase	Aktiviert Guanylatcyclase und verursacht so Ionensekretion
EspP	extracellular serine protease P, Autotransporter	-	Spaltung des Koagulationsfaktors V, Hemmung der Komplementkaskade
EspF	<i>E. coli</i> secreted protein F, Typ-III-Effektor	Verschiedene*	Öffnet tight junctions und induziert Apoptose
EspG	<i>E. coli</i> secreted protein G, Typ-III-Effektor	Cytosol, Golgi	Reorganisation des Zytoskeletts, Homolog des VirA-Proteins in <i>Shigella flexneri</i>
EspH	<i>E. coli</i> secreted protein H, Typ-III-Effektor	PM, „pedestals“	Moduliert die Anordnung von Filopodien und „pedestals“
LifA / Efa-1	Lymphostatin / EHEC factor of adhesion, Lymphotoxin	Lymphozyten	Hemmt Lymphozytenaktivierung; auch Adhäsionsfaktor
Map	mitochondrial associated protein, Typ-III-Effektor	Mitochondrien	Unterbricht mitochondriales Membranpotenzial und stimuliert Filopodienanordnung
NleE	Non-LEE encoded secreted protein, Typ-III-Effektor	Cytosol	Vermutlich Immunmodulation
NleH	Non-LEE encoded secreted protein, Typ-III-Effektor	ER, PM, Cytosol	Vermutlich Immunmodulation
Sfp	Sorbitol-fermenting EHEC O157 fimbriae	-	Fimbrien vermitteln Hämagglutination, evtl. auch Adhärenz
StcE	Secreted protease of C1 esterase inhibitor from EHEC, Typ-III-Effektor / Metalloprotease	C1-INH (C1-Esteraseinhibitor)	Spaltet C1-INH und unterbricht Komplementkaskade
SubAB	Subtilase, AB-Toxin / Cytotoxin	-	Induziert Apoptose
Adhäsiine	Bezeichnung, Bemerkung	Adhäsiine	Bezeichnung, Bemerkung
ToxB	Homolog zu Toxin B aus Clostridien	HCP und TFP	Hemorrhagic Coli Pilus (O157) und Type-IV-Pilus (non-O157)
LPF	long polar fimbriae	Curli	Lange, dünne Proteinfasern zur Adhäsion und Biofilmbildung
Saa	STEC autoagglutinating adhesin	Sab	STEC-autotransporter contributing to biofilm formation

* siehe WONG et al. (2011); PM = Plasmamembran; ER = Endoplasmatisches Retikulum

2.4 Serovaren Shigatoxin-produzierender *E. coli*

Nach SCHEUTZ und STROCKBINE (2005) wird die Serovar eines *E. coli*-Stammes nach folgender Antigenformel angegeben: **O:H:K;F**. Da Kapselantigene jedoch nicht immer vorhanden sind oder wie Fimbrienantigene oftmals nicht untersucht werden, umfasst die Serotypisierung in der Regel die Antigene O und H (O:H). „Serotyp“ und „Serovar“ sind dabei entsprechend den *Bergey's Instructions for Authors* (N.N. 2007) als synonyme Begriffe anzusehen, allerdings wird das Suffix „-var“ weiterhin verwendet, das Suffix „-typ“ zu ersetzen. Dies entspricht dem *International Code of Nomenclature of Bacteria*, in dem die Bezeichnung „Serovar“ ebenfalls bevorzugt wird (LAPAGE et al. 1992). Zur Begründung heißt es in Appendix 10: „The term „type“ in bacteriology should be used strictly for a nomenclatural type [...]. It should not be used to designate a division of a species nor to designate taxa based on antigenic characters.“ Für das alleinige O-Antigen wird meist der Begriff „Serogruppe“ verwendet (KAPER et al. 2004). Neben den bekannten, durchnummerierten Antigenvarianten kommt es in der serologischen Antigenbestimmung häufig zum Nachweis der Antigenformen Orf (rough, auch rau) und Ont (non-typeable). Erstere besagt, dass das LPS keine O-antigenspezifische Polysaccharidkette trägt und dadurch polyagglutinierbar ist (siehe Abschnitt 2.1). Letztere weist darauf hin, dass kein aussagekräftiges Agglutinationsergebnis messbar ist; auch bei den H-Antigenen findet sich die nicht typisierbare Form Hnt. Das Kürzel H- (oder NM; non-motile) hingegen bedeutet, dass keine Geißeln vorhanden sind und der Bakterienstamm demnach unbeweglich ist.

2.4.1 Bedeutende STEC/EHEC-Serovaren beim Menschen

KARMALI et al. (2003a) teilten verschiedene STEC-Serovaren anhand ihres Vorkommens in Bezug auf EHEC-Erkrankungen und -Ausbrüche sowie der Schwere der verursachten Symptome in fünf Seropathovaren ein (Seropathovaren A bis E). Seropathovar A umfasst die Serovaren O157:H7/H-, welche somit als besonders virulent eingestuft wurden. Die Serovaren O26:H11, O103:H2, O111:H-, O121:H19 und O145:H- gehören zur Seropathovar B. Sie verursachen wie Seropathovar A-Stämme

schwere Krankheitsverläufe beim Menschen (Hämorrhagische Colitis bzw. HUS), sind aber seltener als die oben genannten O157-Stämme bei Patienten und Ausbruchsgeschehen nachzuweisen. Laut *Robert Koch-Institut* (RKI) definiert sich ein Ausbruch als eine Gruppe von Fällen bei denen „ein epidemiologischer Zusammenhang dokumentiert“ wird (RKI 2012a). STEC der Seropathovar C (z. B. O91:H21, O104:H21, O113:H2) stehen im Gegensatz zu solchen der Seropathovar D in Verbindung mit schweren Erkrankungen beim Menschen, weisen jedoch ebenfalls ein geringes Vorkommen auf und sind nur selten im Rahmen eines Ausbruchs nachzuweisen. STEC der Seropathovar E wurden bislang nicht beim Menschen nachgewiesen. Einer Studie der *European Food Safety Authority* (EFSA; Daten der Jahre 2007 bis 2009 aus dem Europäischen Wirtschaftsraum) zufolge, belegen die Serogruppen O157, O26, O145, O111, O103 und O121 die ersten Plätze der HUS-assoziierten EHEC-Serogruppen in Europa (ECDC/EFSA 2011). Damit einher gehen die Serotypisierungsergebnisse der EHEC-Isolate deutscher HUS-Patienten - mit Ausnahme des Ausbruchsstammes EHEC O104:H4 von 2011 (RKI 2010, 2011a, 2012a). MELLMANN et al. (2008a) veröffentlichten die bis heute gültige HUSEC-Liste, in der sie EHEC-Isolate von 524 HUS-Patienten auswerteten. Insgesamt wurden 42 HUS-assoziierte EHEC-Stämme erfasst, wovon 93,7 % zu den oben genannten fünf Serogruppen gehören. In den USA gehören diese Serogruppen ebenfalls zu den häufigsten beim EHEC-erkrankten Menschen gefundenen und O26, O103, O111 und O145 machen 64,4 % der nicht-O157 Isolate aus (USDA 2012a).

In Verbindung mit schweren Krankheitsverläufen ist die Serogruppe O157 von besonderer Bedeutung. Bereits im Jahr 1982 wurden STEC O157 im Rahmen des ersten großen, lebensmittelassoziierten STEC-Ausbruch in den USA nachgewiesen (CDC 1982). Der erste verzeichnete europäische O157-Ausbruch ereilte 1983 Großbritannien (TAYLOR et al. 1986). Heute finden sich STEC O157 laut ECDC/EFSA (2011) bei 71 % der EHEC-bedingten HUS-Fälle Europas bzw. wurden in 68 % der HUSEC-Stämme nach MELLMANN et al. (2008a) nachgewiesen.

2.4.1.1 Pathogenitätsfaktoren bedeutender *E. coli*-Serovaren

Was aber macht die STEC-Stämme der Serogruppen O157, O26, O103, O111 und O145 so besonders „virulent“? Forschergruppen weltweit untersuchen die genetischen Grundlagen der unterschiedlichen Virulenz verschiedener STEC-Stämme, wobei die Differenzierung zwischen hochvirulenten und weniger virulenten STEC-Stämmen gerade bei nicht-O157 Serovaren ein bislang ungelöstes Problem darstellt (COOMBES et al. 2011). Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass die Kombination verschiedener Pathogenitätsfaktoren ausschlaggebend für die Virulenz eines STEC-Stammes ist (COOMBES et al. 2008; BUGAREL et al. 2010).

OGURA et al. (2009) sequenzierten drei Seropathovar B-Stämme (O26:H11, O103:H2 und O111:H-) und verglichen die Genomsequenzen mit denen anderer *E. coli*, einschließlich der Serogruppe O157. Die Genome der STEC-Stämme waren erwartungsgemäß größer als die der avirulenten *E. coli*-Stämme, wobei der überwiegende Anteil des zusätzlichen Genmaterials aus Phagen und Pathogenitätsinseln bestand. Interessanterweise glichen oder ähnelten sich die gefundenen Virulenzgene der verschiedenen STEC-Stämme zwar – so trugen beispielsweise alle ein Enterohämolysin-kodierendes Virulenzplasmid, die Lokalisation bzw. Organisation der Virulenzgene unterschied sich jedoch voneinander. Aufgrund dessen wird eine unabhängige Integration der Virulenzgene in Form von mobilen genetischen Elementen vermutet, also von einer „parallelen Evolution“ einzelner *E. coli* zu hochvirulenten EHEC-Stämmen ausgegangen (OGURA et al. 2009).

Hauptpathogenitätsfaktoren jedes STEC-Stammes sind die **Shigatoxine** (siehe Abschnitt 2.3.1.1). ZHANG et al. (2000) wiesen nach, dass es Mitte der 1990er Jahre zu einer Veränderung im Genprofil von STEC O26-Stämmen aus Deutschland und der damaligen Tschechoslowakei kam. Alle Isolate aus den Jahren davor waren ausschließlich *stx1*-positiv gewesen. Seit 1995 jedoch traten zunehmend STEC O26-Stämme mit dem toxischeren Shigatoxin 2 auf. Eine dementsprechende Entwicklung stellten auch CHASE-TOPPING et al. (2012) in Schottland seit dem Jahr 2010 fest. Untersuchungen durch ZHANG et al. (2007) zeigten eine

ähnliche Tendenz für STEC der Serogruppe O111: Um die Jahrtausendwende war es in Deutschland zu einem Anstieg der *stx1/stx2*-positiven Isolate gekommen, nachdem bisher ausschließlich *stx1*-positive Stämme vorherrschten. Da *stx2* mit schweren Erkrankungen assoziiert ist, sind diese Stämme demnach potenziell virulenter als ihre Vorgänger. Aber auch wenn Shigatoxine bei Erreichen der Zielgewebe im menschlichen Organismus große Schäden verursachen, reicht doch die bloße Fähigkeit Stx zu produzieren und freizusetzen nicht aus, um einen STEC-Stamm hochvirulent zu machen (COOMBES et al. 2008; DE SABLET et al. 2008; KONCZY et al. 2008). STÅHL et al. (2009) wiesen nach, dass sowohl Stx2 als auch bakterielles LPS im menschlichen Blut zur Bildung von Thrombozyten/Leukozyten-Aggregaten, prokoagulant wirkenden Mikropartikeln und zur Freisetzung von TF (tissue factor) führen, was einen prothrombotischen Status auslöst und somit eine folgende Thrombose begünstigt. Wurden Stx2 und LPS kombiniert eingesetzt, war ein additiver Effekt zu beobachten und auch hohe Scherkräfte im Blutfluss - wie sie im Kapillargebiet der Nierenglomeruli zu finden sind - erhöhten die Stx2- und/oder LPS-induzierte TF-Freisetzung. Bemerkenswert ist dabei die Feststellung, dass O157:H7-LPS einen stärkeren Effekt erzielte, als das LPS anderer (nicht-O157) Serovaren.

Die Frage, ob hochvirulente STEC eventuell eine höhere **Säuretoleranz** und somit eine niedrigere Infektionsdosis als weniger virulente STEC haben, wurde ebenfalls ausgiebig diskutiert. Während der Vergleich zwischen STEC der Serogruppen O157 und nicht-O157 keine signifikanten Unterschiede ergab, konnte in einer anderen Studie jedoch eine erhöhte Säuretoleranz bei ausbruchsassoziierten Stämmen gegenüber Stämmen aus Lebensmitteln, Mensch und Tier nachgewiesen werden (JACOBSEN et al. 2009; USDA 2012a). Zudem beobachteten HOUSE et al. (2009) eine Virulenzsteigerung bei EHEC O157:H7-Stämmen, nachdem diese einem Säurestress ausgesetzt worden waren, welcher die Umgebungssituation bei der humanen Magenpassage bzw. im anorektalen Darmmilieu von Rindern oder in säurehaltigen Lebensmitteln imitierte. Sowohl die Adhäsion der vorbehandelten Stämme an Epithelzellen sowie die Apoptoserate dieser Epithelzellen erhöhte sich

signifikant im Gegensatz zur Infektion mit nicht vorbehandelten O157:H7-Stämmen.

Die bakterielle **Kolonisation** im Darm des Wirtsorganismus ist ein entscheidender Faktor bei STEC-Infektionen. Serovarenspezifische Virulenzgenprofile wie zum Beispiel O145/eae oder O111/eae/efa1 wurden beschrieben und manche Pathogenitätsfaktoren, wie die LPF (long polar fimbriae) von O157:H7/H-, scheinen ausschließlich zu bestimmten Serovaren zu gehören (SONNTAG et al. 2004; ZHANG et al. 2007; BIELASZEWSKA et al. 2009a). So zeigten MAHAJAN et al. (2009), dass H7-Flagellen aus O157-Stämmen im Gegensatz zu Flagellen anderer *E. coli*-Stämme zusätzlich zur Funktion der bakteriellen Beweglichkeit auch als Adhäsine bei der Besiedelung von bovinem Darmepithel wirken. Die STEC-Stämme O157:H7 und O157:H- der Seropathovar A tragen neben der bereits beschriebenen chromosomalen Pathogenitätsinsel LEE zusätzlich die Pathogenitätsinsel OI 122 (O island 122) und auch mit den Stämmen der Seropathovar B werden beide Pathogenitätsinseln oder zumindest variable Anteile davon in Verbindung gebracht (KONCZY et al. 2008). O-Inseln finden sich ausschließlich im Genom pathogener *E. coli*; OI 122 ist unter LEE-positiven *E. coli* weit verbreitet und kodiert Nle (non LEE-encoded effector)-Proteine, welche als Substrate des wiederum LEE-kodierten T3SS in die Wirtszelle gelangen (COOMBES et al. 2008; KONCZY et al. 2008; OGURA et al. 2009; siehe hierzu auch Abschnitt 2.1.3.2). Während die Entstehung der LEE-vermittelten A/E-Läsionen an der Darmschleimhaut infizierter Wirte weitestgehend ergründet ist, kommt die genaue Funktion vieler Effektorproteine gerade erst ans Licht. Sie interagieren mit Wirtszellen in verschiedener Weise: induzieren oder hemmen z. B. die Apoptose oder schwächen die Immunantwort des Wirtsorganismus (SCHMIDT 2010; WONG et al. 2011; siehe auch Tabelle 2.1). Das T3SS und die zugehörigen Effektorproteine spielen eine wichtige Rolle bei der Kolonisation und Persistenz im tierischen Reservoirwirt. Eine gesteigerte Adhärenz - z. B. im Rinderdarm - ist zugleich ein Selektionsvorteil und beeinflusst ebenfalls die Virulenz nach Aufnahme in den menschlichen Organismus (COOMBES et al. 2011).

Klassische EHEC sind per definitionem LEE-positiv, es gibt allerdings auch atypische EHEC, die keine LEE-Pathogenitätsinsel tragen (BRZUSZKIEWICZ et al. 2011). Hierzu gehören beispielsweise STEC-Stämme der Serovaren O113:H21, O91:H21 und O104:H21, welche als seltene Auslöser schwerer Erkrankungsverläufe beim Menschen zur Seropathovar C gezählt werden (NEWTON et al. 2009; BUGAREL et al. 2010). Solche Stämme produzieren LEE-unabhängige Kolonisationsfaktoren, wie das Saa (STEC autoagglutinating adhesin) oder den Efa1 (EHEC factor of adhesion; USDA 2012a).

Trotz aller neuen Erkenntnisse zu den hier aufgeführten und zahlreichen anderen Pathogenitätsfaktoren, -inseln und Virulenzplasmiden lässt sich weiterhin nicht feststellen, welche Genkombination genau nun ausschlaggebend für die hohe Virulenz mancher STEC-Stämme ist (FRATAMICO et al. 2011). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Virulenz eines STEC-Stammes vorrangig von der Kombination verschiedener Pathogenitätsfaktoren und nicht allein vom Hauptpathogenitätsfaktor Shigatoxin abhängt. Dabei sind Kolonisationsfaktoren von besonderer Bedeutung, denn eine lange Verweildauer im Darmtrakt des Reservoirwirts bedeutet einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Bakterienstämmen und erhöht auch die Übertragungswahrscheinlichkeit auf Lebensmittel oder durch direkten Kontakt. Bei dem im folgenden Abschnitt dargestellten, *ea* ϵ - und *EhlyA*-negativen, aber AAF-positiven EHEC O104:H4 aus dem Jahr 2011 dürfte dies mit eine der Ursachen für die hohe Zahl an schwer erkrankten Patienten gewesen sein. Serovarenspezifische Kombinationen von Virulenzgenen sind bekannt und treten gehäuft auf. Jedoch werden die *E. coli*-Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157 nicht ausschließlich bei hochvirulenten STEC-Stämmen nachgewiesen. Sie finden sich ebenfalls bei anderen *E. coli*-Pathovaren wie EPEC (BIELASZEWSKA et al. 2008; KOZUB-WITKOWSKI et al. 2008; SCHMIDT 2010; YAN et al. 2012), ETEC (GYLES und FAIRBROTHER 2010) und EAEC (ZHANG et al. 2007) oder bei apathogenen *E. coli*-Stämmen (BUGAREL et al. 2011). Demnach kann die Detektion einer Serogruppe nicht zur Einstufung der Virulenz eines *E. coli*-Stammes dienen. Zuletzt sind auch der Immunstatus und

Abwehrreaktionen des Wirtsorganismus entscheidend in Bezug auf die Virulenz eines Erregerstammes. Denn da nicht alle, sondern „nur“ bis zu 15 % der an EHEC O157 erkrankten Kinder HUS entwickeln, muss es neben dem Bakterium selbst noch weitere hemmende oder begünstigende Faktoren geben (BOYER und NIAUDET 2011).

2.4.1.2 EHEC O104:H4 – ein Ausnahmefall

Im Jahr 2011 fand in Norddeutschland ein EHEC-Ausbruch zuvor ungekannten Ausmaßes statt: 2966 Patienten erkrankten deutschlandweit an EHEC O104:H4-bedingter Gastroenteritis, 827 erlitten die post-infektiöse Komplikation HUS und 53 Menschen starben an den Folgen der Infektion; der Krankheitsverlauf unterschied sich insofern von dem vorheriger EHEC-Ausbrüche, als dass vor allem Erwachsene betroffen waren und die Inkubationszeit mit durchschnittlich acht Tagen länger als bei sonstigen EHEC-Infektionen dauerte (RKI 2012a). Zudem war der deutlich überwiegende Anteil an erkrankten Frauen sowie die besonders hohe Anzahl an HUS-Patienten und Todesfällen außergewöhnlich (RUGGENENTI und REMUZZI 2011). Weltweit wurden zusätzlich rund 900 tatsächlich und vermutlich Betroffene gezählt, die sich z. B. auf Reisen durch Deutschland mit EHEC O104:H4 angesteckt hatten – 34 dieser Patienten verstarben (EFSA 2011a).

Bis zu jenem Ausbruch war die STEC-Serovar O104:H4 selten und nur in vereinzelt Fällen Ursache von HUS-Erkrankungen (BfR 2011a). In der HUSEC-Liste wurde zuvor lediglich ein einziger solcher *E. coli*-Stamm dokumentiert (HUSEC041, aus dem Jahr 2001; MELLMANN et al. 2008a; ECDC/EFSA 2011). Mit der Genomsequenzierung des 2011er Ausbruchsstammes sowie des HUSEC041-Stammes von 2001 wurde die besondere Ausstattung dieser Stämme aufgedeckt: sie tragen zwar jeweils ein *stx2*-Gen (Untergruppe *stx2a*), sind aber aufgrund ihrer genetischen Merkmale enger mit enteroaggregativen *E. coli* als mit STEC verwandt (BRZUSZKIEWICZ et al. 2011; MELLMANN et al. 2011). Wie EAEC-Stämme bilden EHEC O104:H4 die Adhäsine AAF (aggregative adherent fimbriae) aus, mit deren Hilfe sie sich an die Darmschleimhaut anlagern und einen Biofilm ausbilden können (BRZUSZKIEWICZ et al.

2011). Im Gegensatz zu den meisten humanvirulenten STEC ist dieser Stamm in der molekularbiologischen Untersuchung weder *eae*- noch *EhlyA*-positiv; weitere Eigenschaften sind unter anderem die Sorbitfermentation und vielfache Resistenzen gegen verschiedene Beta-Laktam-Antibiotika (ECDC/EFSA 2011). Obwohl die Entstehung eines solchen Virulenzgenprofils theoretisch jederzeit möglich ist, sind „*stx*-positive EAEC“ bisher nur sporadisch als Auslöser von schweren Erkrankungen oder Ausbrüchen dokumentiert (MORABITO et al. 1998; IYODA et al. 2000; MELLMANN et al. 2008a).

BRZUSZKIEWICZ et al. (2011) regten an, dass aufgrund der ungewöhnlichen Genkombination eine neue Pathovar entstanden sei (EAHEC, Entero-Aggregative-Haemorrhagic *E. coli*). BEUTIN (2011) bezeichnet solche Stämme als aEHEC (aggregative EHEC), während MELLMANN et al. (2011) den Ausbruchsstamm trotz der EAEC-Komponente als *eae*-negativen EHEC definieren.

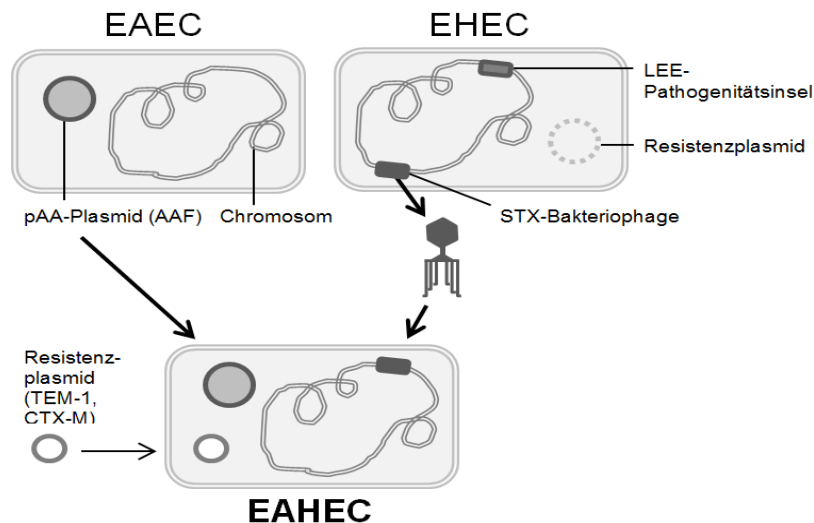


Abb. 2.6: Mögliche Entstehung der EAHEC modifiziert nach BRZUSZKIEWICZ et al. (2011). EAHEC O104:H4 sind in der PCR positiv für *stx2a*, AAF-kodierende Gene und Gene, welche eine ESBL (CTX-M) sowie eine Beta-Laktamase (TEM-1) kodieren.

Im Gegensatz zu den meisten STEC soll kein tierischer Wirt, sondern EAEC-typisch der Mensch selbst das Reservoir von EHEC O104:H4 sein (BfR 2011a). Bislang fanden sich auch keine EHEC O104:H4-Stämme bei Rindern (dem Reservoir klassischer STEC) und so wird von einer Übertragung via human-fäkal kontaminierten Lebensmitteln bzw. von Mensch zu Mensch ausgegangen (BEUTIN 2011; HAURI et al. 2011;

WIELER et al. 2011b). Als ermittelte Ursache des EHEC-Ausbruchs 2011 gelten Bockshornkleesamen aus einem kleinen Betrieb in Ägypten, dessen Anbaumethoden nicht entsprechend dem Codex Alimentarius für Sprossensamen erfolgten (WICHMANN-SCHAUER et al. 2012).

Ende Juli 2011 wurde der EHEC O104:H4-Ausbruch für beendet erklärt. Obwohl seit diesem Zeitpunkt keine schweren Erkrankungen mehr dokumentiert wurden, ist es wahrscheinlich, dass der Erreger weit darüber hinaus von asymptomatischen Trägern ausgeschieden wird (RKI 2011b).

2.4.2 Humanvirulente STEC in Lebensmitteln und Wasser

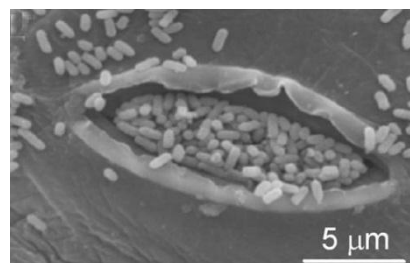
Lebensmittel sind die häufigste Ursache von STEC-Ausbrüchen beim Menschen (KASPAR et al. 2010). Im Jahr 2011 wurden in Deutschland 75 potenzielle und explizite lebensmittelbedingte EHEC-Ausbrüche gezählt (RKI 2012a). MARTIN und BEUTIN (2011) konnten nachweisen, dass STEC-Kontaminationen tierischer Lebensmitteln mehrheitlich von den lebensmittelliefernden Tieren – meist Wiederkäuern - selbst stammen. Zudem kann es auch zu indirekten Kontaminationen durch Düngemittel (Gülle, Stallmist) oder fäkaler Kontamination von Wasser für die Lebensmittelproduktion kommen, so dass auch nicht-tierische Lebensmittel zu einer Infektionsquelle für den Menschen werden können (FREMAUX et al. 2008; CASTRO-ROSAS et al. 2012). Das Zubereiten von Speisen ist ein ebenso heikler Punkt und vor allem rohe oder unzureichend gegarte Lebensmittel sind anfällige Infektionsquellen (EFSA 2011b).

Vor allem **tierische** Lebensmittel, wie Fleisch und Milch, sind Überträger humanvirulenter STEC-Stämme. In der Literatur werden STEC der Serogruppen O157, O26, O103, O111 und O145 vorrangig in Proben aus Rindfleisch (häufig Hackfleisch) beschrieben, aber auch Ziegen-, Reh-, Schweine- sowie Wildschwein- und Hasenfleisch werden als Träger dieser Stämme genannt (MIKO et al. 2009; GILL und GILL 2010; OJO et al. 2010; BOSILEVAC und KOOHMARAIE 2011; ROUNDS et al. 2012). Milch gilt ebenfalls als mögliche Infektionsquelle. Rohmilch und Rohmilcherzeugnisse bergen diesbezüglich ein besonderes Risiko. BAYLIS (2009) verweist hierbei auf potenziell humanvirulente STEC aus Kuhmilch,

Schafs- und Ziegenmilch, unter anderem der Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157. In einer französischen Studie wurden in Milchproben jedoch vornehmlich STEC-Stämme anderer Serogruppen gefunden und ein Vergleich mit aus HUS-Patienten isolierten STEC brachte deutliche Unterschiede bezüglich der enthaltenen Virulenzgene: so trugen HUS-assoziierte STEC in der Regel *stx2*-Gene, während Milch-assoziierte STEC hauptsächlich *stx1*-positiv waren (PRADEL et al. 2008). STEC O157:H7 und andere Serovaren wurden vereinzelt auch in Schalentieren nachgewiesen (BENNANI et al. 2011).

Wie oben bereits erwähnt ist das Infektionsrisiko bei roh verzehrten Lebensmitteln besonders hoch, weil STEC hier nicht während der Zubereitung durch Hitzezufuhr abgetötet werden. Da sich in den letzten Jahrzehnten aber immer mehr Menschen einem gesünderen Lebensstil zugewandt haben, steigt dementsprechend auch die Zahl der STEC-Ausbrüche aufgrund **nicht-tierischer Lebensmittel**; Quellen sind häufig Blattgemüse, wie Salate und Spinat, aber auch unpasteurisierter Apfelsaft und verschiedene Sprossensorten bzw. deren Saatgut - wie es beim EHEC O104:H4-Ausbruch von 2011 der Fall war (LYNCH et al. 2009; BERGER et al. 2010; ECDC 2011). Zudem können *E. coli* auch über äußere Verletzungen, über die Stomata oder die Wurzeln ins Innere von pflanzlichen Lebensmitteln gelangen, so dass bloßes Waschen vor dem Verzehr nicht mehr genügt, um die Bakterien ausreichend zu dezimieren (SALDAÑA et al. 2011; EFSA 2011b).

Abb. 2.7:
Elektronenmikroskopische Aufnahme
nach SALDAÑA et al. (2011):
24 Stunden nach der experimentellen
Kontamination von jungem Spinat sind
die Stomata der Blätter stark von STEC
O157:H7 besiedelt.



CHAURET (2011) beschreibt das wochenlange Überleben von *E. coli* O157:H7 auf Blattgemüse, Äpfeln und diversen anderen Obstsorten und auch in Wasser können *E. coli* O157:H7 nach Wochen noch nachgewiesen werden.

Dem *Umweltbundesamt* zufolge ist die STEC-Verbreitung über deutsches Trinkwasser jedoch unwahrscheinlich. „Kleine Wasserversorgungen [wie z. B.] private Hausbrunnen“ sowie das Baden in ungechlorten Gewässern oder Flüssen sind hingegen mögliche, wenn auch sehr seltene Eintragsquellen (UBA 2011).

Es ist auch hier wichtig, darauf hinzuweisen, dass sich potenziell humanvirulente STEC-Stämme bei Lebensmitteln und Wasser nicht allein auf die Serogruppen O26, O103, O111, O145 oder O157 beschränken.

2.4.3 Humanvirulente STEC beim Tier

Shigatoxin-produzierende *E. coli* sind Teil der Darmflora vieler Tierarten. Wiederkäuer im Allgemeinen und insbesondere Rinder gelten als das Hauptreservoir und die Hauptquelle von STEC (OPORTO et al. 2008). Dabei besteht teilweise eine enge, phylogenetische Verwandtschaft zwischen tierischen und humanen STEC-Stämmen, wie z. B. bei bovinen und humanen STEC der Serogruppe O26 (CLERMONT et al. 2011). STEC wurden ebenfalls in Wildwiederkäuern gefunden, wobei in Spanien auch STEC O157 nachgewiesen werden konnten, jedoch weder die Serogruppe O103, O111 noch O145 (GARCÍA-SÁNCHEZ et al. 2007; SÁNCHEZ et al. 2009). In Studien aus Deutschland und Belgien zeigte sich keine der fünf Serogruppen bei Wildwiederkäuern (BARDIAU et al. 2010; EGGERT 2011). STEC im Allgemeinen wurden zudem bei anderen Tierarten wie z. B. Wildschweinen (SÁNCHEZ et al. 2010), Hunden und Katzen (KATAOKA et al. 2010; BENTANCOR et al. 2012) sowie Pferden, Hasen, Schalentieren und Transportwirten wie Tauben, Nagern, Fliegen und Käfern entdeckt (KASPAR et al. 2010). Zwei Quellen berichten von STEC O145 bei Hauskatzen (BUSCH et al. 2007; RUMI et al. 2012).

Eine direkte Übertragung vom Tier zum Menschen ist im Vergleich zur lebensmittelbedingten Übertragung oder Kontakt zu infizierten Menschen zwar selten, es sind jedoch Fälle ausgehend von beispielsweise Bauernhöfen oder Streichelzoos bekannt (RANGEL et al. 2005; KASPAR et al. 2010).

2.5 Rechtliche Grundlagen zu STEC und das Meldewesen

In Deutschland widmet sich das *Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen* (IfSG) dem Umgang mit ansteckenden Erregern. Um die Ausbreitung einer EHEC-Erkrankung frühzeitig zu erkennen und einzudämmen und ist der direkte oder indirekte Nachweis von EHEC bei Verdacht auf eine akute Infektion meldepflichtig (IfSG § 7, Abs. 1, Nr. 12a). Ebenso meldepflichtig ist der Verdacht auf, die Erkrankung oder der Tod an HUS (IfSG § 6, Abs. 1, Nr. 1). Meldepflicht besteht nach IfSG § 6, 7 und 8 für Leiter von Untersuchungsämtern und –stellen, für Leiter von Einrichtungen der pathologisch-anatomischen Diagnostik und im Falle von HUS auch für Ärzte und weitere verantwortliche Personen (siehe IfSG § 8). Die Meldung ist binnen 24 Stunden nach Diagnosestellung an das zuständige Gesundheitsamt zu richten (IfSG § 9, Abs. 3). Bei Verdacht auf oder Erkrankung an EHEC-Enteritis dürfen betroffene Personen nicht in einer Gemeinschaftseinrichtung arbeiten oder sich in den Räumen einer solchen Einrichtung aufhalten (IfSG § 34). EHEC-Ausscheider müssen diesbezüglich Anweisungen des Gesundheitsamtes befolgen und dürfen bei der Arbeit keinen Kontakt mit vielen Lebensmitteln oder Bedarfsgegenständen, die in Kontakt mit den genannten Lebensmitteln stehen, haben (IfSG § 34, Abs. 2 und § 42, Abs. 1 und 2). Das Gesundheitsamt meldet die registrierten Fälle über die Landeszentralen wiederum an das RKI, welches die Daten sammelt und für ganz Deutschland infektionsepidemiologisch auswertet; zusätzlich werden seit 2004 auch die Daten zu lebensmittelbedingten Ausbrüchen erhoben (RKI 2012a). Daten zu STEC-Infektionen beim Menschen werden regelmäßig an das *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) übermittelt und von diesem jährlich in Zusammenarbeit mit der EFSA veröffentlicht (ECDC/EFSA 2011).

STEC als lebensmittelassoziierte Krankheitserreger unterliegen in Deutschland den Bestimmungen des *Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuches* (LFGB). Es findet eine Beobachtung von STEC in Lebensmitteln „im Rahmen der betrieblichen Eigenkontrollen [und] der amtlichen Überwachung“ statt (BfR 2011a). Verzehrsfertige STEC-positive Lebensmittel werden – unabhängig von der Serovar –

gemäß § 5 LFGB und Artikel 14 Absatz 1 in Verbindung mit Absatz 2a der VO (EG) Nr. 178/2002 als gesundheitsschädlich beanstandet, sofern ein lebensfähiges STEC-Isolat nachgewiesen wurde. Erste Schritte zu einer genaueren Differenzierung der Virulenz von STEC werden gemacht, wobei es hierfür mancherorts zunächst zu einer erweiterten Diagnostik kommen muss. Denn die europäische Rechtslage ist in Bezug auf die Diagnostik und Beurteilung von STEC in Lebensmitteln nicht einheitlich. In ihrem Bericht von 2011 empfehlen ECDC und EFSA den Nachweis von STEC aus Lebensmitteln und Tieren auf diverse nicht-O157 (u.a. O26, O103, O111, O145) auszudehnen, da STEC-verdächtige Proben in vielen EU-Ländern entsprechend früherer Empfehlungen von vorn herein selektiv auf O157 hin untersucht wurden (ECDC/EFSA 2011). Diese Vorgehensweise ist im Hinblick auf die schweren Erkrankungsverläufe verursacht durch STEC-Stämme anderer Serogruppen jedoch zu einseitig. Ende des Jahres 2012 veröffentlichte die *International Organization for Standardization* (ISO) nun eine Norm, wonach neben den *stx*-Genen und dem *eae*-Gen auch die fünf STEC-Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157 zur Beurteilung der Virulenz von Lebensmittelkontaminanten detektiert werden (ISO/TS 13136:2012). In den USA führte das amerikanische Landwirtschaftsministerium (*U.S. Department of Agriculture*, USDA) ebenfalls 2012 eine Vorschrift ein, welche die bisherige Beanstandung von O157:H7-STEC als Lebensmittelkontaminant in rohen Rinderfleischprodukten (z. B. Hackfleisch) um sechs STEC-Serogruppen erweitert, insofern sie *eae*-positiv sind (USDA 2012b). Hierzu gehören neben den oben genannten Serogruppen auch O45 und O121.

In Wasser werden STEC nur selten und wenn, dann in deutlich geringerer Konzentration als gewöhnliche *E. coli* nachgewiesen (UBA 2011). Trinkwasser darf als Lebensmittel keine STEC enthalten (VO (EG) Nr. 178/2002, Art. 14 Abs. 1 in Verbindung mit Abs. 2a; § 5 LFGB). Die *Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch* (TrinkwV) legt die routinemäßige Untersuchung von Trinkwasser auf *E. coli* sowie einen Grenzwert von 0 KbE pro 100 ml Trinkwasser (bzw. 0 KbE/250 ml Trinkwasser in verschlossenen Behältnissen) fest

(TrinkwV § 5 Anl. 1 Teil I und II, §§ 14 und 19 Anl. 4, Teil Ia). Die Wasserqualität von oberirdischen Gewässern wird in Bayern anhand der *Verordnung über die Qualität und die Bewirtschaftung der Badegewässer* (BayBadeGewV) eingestuft. Bei einer maximalen Anzahl von 500 KbE *E. coli* pro 100 ml ist die Wasserqualität ausgezeichnet, ab 1800 KbE *E. coli* pro 100 ml gilt sie als nicht mehr ausreichend, um gefahrlos darin zu Baden (BayBadeGewV Anl.1; UBA 2011).

Zudem fallen STEC als Zoonoseerreger in Deutschland unter das *Tierseuchengesetz* (TierSG). Im vorrangigen europäischen Recht wird die Überwachung von Zoonoseerregern und die epidemiologische Untersuchung lebensmittelbedingter Krankheitsausbrüche durch die Richtlinie 2003/99/EG geregelt (Kap. I Art. 1 a und c). STEC (VTEC) gehören dabei zu den überwachungspflichtigen Zoonoseerregern (2003/99/EG Anh. I A). Nach Artikel 8 ist die zuständige Behörde verpflichtet, lebensmittelbedingte Krankheitsausbrüche zu untersuchen und die erhobenen Daten an die EU-Kommission zu vermitteln. Über die Kommission gelangen diese Angaben dann schlussendlich zur EFSA. Um den Anforderungen dieser EG-Richtlinie Folge zu leisten, erfolgt das Zoonose-Monitoring in Deutschland auf Grundlage der *AVV Zoonosen Lebensmittelkette* entsprechend dem Zoonosen-Stichprobenplan des *Bundesinstituts für Risikobewertung* (BfR). Die ermittelten Daten sollen Aufschluss über Entwicklungen, Epidemiologie und Vorkommen von STEC in der Lebensmittelkette geben, weshalb wechselnde Schwerpunkte gesetzt werden. 2011 waren es Kot-, Schlachtkörper- und Nasentupferproben von Mastrindern, Hackfleisch und Fleisch vom Rind sowie Weichkäse und halbfester Schnittkäse, die deutschlandweit auf STEC untersucht wurden.

2.6 Molekularbiologischer *E. coli*-Serogruppennachweis

Für die molekularbiologische Serotypisierung von *E. coli* gibt es verschiedene Ansätze. Microarray-Systeme beispielsweise eignen sich insbesondere für ein breites Serovaren-Screening, da Proben mit nur einem Ansatz parallel auf eine große Anzahl an O- und H-Antigenen untersucht werden können (BALLMER et al. 2007; GEUE et al. 2010).

Weiterführend wird aktuell an Sequenzierungsmethoden gearbeitet, um *E. coli*-O-Gruppen nachzuweisen (JENKE et al. 2011; KARCH, persönliche Mitteilung). Zu den am häufigsten eingesetzten molekularbiologischen Serotypisierungsverfahren zählt die Real-Time PCR (Real-Time Polymerasekettenreaktion) als schnelle und effiziente Nachweismethode (u.a. PERELLE et al. 2004; GILMOUR et al. 2007; MONDAY et al. 2007). Multiplex PCR-Systeme ermöglichen es zudem, verschiedene Gene gleichzeitig nachzuweisen, was den Zeitaufwand für die Diagnostik zusätzlich verkürzt.

PERELLE et al. (2004, 2005) entwickelten Singleplex PCR-Systeme zum Nachweis der *E. coli*-Serogruppen O26, O111, O145 und O157, deren Primer- und Sondensequenzen Grundlage dieser Arbeit sind. Da es bei dem 2004 veröffentlichten, *eae*-basierten PCR-Nachweis von *E. coli* O103 zu Kreuzreaktionen mit den *E. coli*-Serogruppen O4 und O45 kam, wurde dieses System modifiziert, so dass der *E. coli* O103-Nachweis nun anhand von Sequenzen des *wzx*_{O103}-Gens aus dem Genlokus für die Biosynthese der O-spezifischen Polysaccharide erfolgt (PERELLE et al. 2005). *Wzx*-Gene kodieren Flippasen (Transportproteine), die für den Membrandurchtritt von O-Antigeneinheiten von Bedeutung sind (LIU et al. 2008). Die Detektion der Serogruppe O26 erfolgt ebenfalls aufgrund eines *wzx*_{O26}-Gens. Dahingegen wird die Serogruppe O111 anhand des von WANG et al. (1998) sequenzierten *wbd1*_{O111}-Gens nachgewiesen. Dieses Gen ist Teil des O111-Antigen-Clusters und wird auch als *gmm*-Gen bezeichnet (WANG und REEVES 2000b; BEUTIN et al. 2009). *Gmm*-Gene kodieren das Enzym GDPMH (GDP-mannose mannosyl hydrolase), dessen genaue Funktion in diesem Zusammenhang in der Literatur noch nicht beschrieben ist (WANG und REEVES 2000b). Das *ihp1*_{O145}-Gen zum Nachweis der Serogruppe O145 kodiert ein hypothetisches Protein (inserted hypothetical protein), welches *in vivo* bislang nicht nachgewiesen werden konnte (BEUTIN et al. 2009). Der Nachweis von *E. coli* O157 erfolgt anhand des *rfbE*_{O157}-Gens. Dieses Gen kodiert die Perosamin-Synthetase, welche zur Synthese des O157-Antigen-Polysaccharids beiträgt (MIYASHITA et al. 2012).

III. MATERIAL UND METHODEN

Ausführliche Angaben zu den verwendeten Nährmedien, Reagenzien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien sowie Geräten sind in Anhang 8.1 aufgelistet.

3.1 Probenmaterial und Probenbearbeitung

Das *Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit* (LGL), Oberschleißheim, erhält humane Proben zur EHEC- bzw. EPEC-Untersuchung von den bayerischen Gesundheitsämtern im Rahmen der Tätigkeit des öffentlichen Gesundheitsdienstes. Zur Einsendung gelangen vorwiegend Stuhlproben, aber auch Bakterienstämme, Flüssigkulturen und andere Proben von Patienten mit klinischer, EHEC- bzw. HUS-verdächtiger Symptomatik sowie von Personen mit Kontakt zu erkrankten Patienten (Umgebungsuntersuchungen). Die amtliche Lebensmittelüberwachung sendet zudem Plan-, Verdachts- und Beschwerdeproben aus Südbayern an das LGL. Untersucht werden hierbei tierische und nicht tierische Lebensmittel. Zuletzt werden auch Verdachtsproben von Oberflächengewässern und Trinkwasser auf STEC hin analysiert. Da STEC (VTEC) in der Lebensmittelkette gemäß der Richtlinie 2003/99/EG Anh. I A zu den überwachungspflichtigen Zoonoseerregern gehören, werden außerdem tierische Kot- und Schlachtkörperproben entsprechend dem Zoonosen-Stichprobenplan des BfR zur STEC-Analytik eingeschickt.

Die Anzucht der verschiedenen Probenarten ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Angezüchtete Mischkulturen wurden mit sterilen Wattetupfern in 1,5 ml sterile, physiologische NaCl-Lösung überführt. Dabei wurden ausschließlich bakterielle Kolonien abgenommen, um eine Hemmung der PCR durch Inhibitoren im Probenmaterial zu vermeiden. 20 µl der Bakteriensuspension wurden in 400 µl steriles Wasser pipettiert, gemischt und anschließend für 15 Minuten bei 95 °C gekocht. Zuletzt wurden die Proben für 15 Sekunden bei 14000 rpm zentrifugiert, um die kondensierte Flüssigkeit im Deckel zu entfernen und damit einer Kontamination der Umgebung bzw. der Handschuhe beim Öffnen des Deckels vorzubeugen. Derart behandelte Proben sind nun nicht mehr infektiös und zur DNA-

Analytik geeignet, da die Überführung in steriles Wasser und das Kochen die Bakterienzellen zerstört und die DNA freisetzt. Vorbereitete Mischkulturen wurden anschließend per Real-Time PCR auf das Vorhandensein von *stx*-Genen hin untersucht (REISCHL et al. 2002; PAVLOVIC et al. 2010) und *stx*-positive Mischkulturen durch eine wiederholte PCR-Analyse bestätigt. Abhängig vom Probenaufkommen standen dabei zwei verschiedene Geräte zur Verfügung (LightCycler® 2.0 und LightCycler® 480, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Mittels Keimsuche bzw. Kolonieblothybridisierung erfolgte die Isolierung der *stx*-positiven Einzelkeime, welche im Anschluss per biochemischer Differenzierung (BD Phoenix™ System, BD Diagnostics, Heidelberg) oder MALDI-TOF-MS-Verfahren (microflex™ LT system, Bruker Daltonik GmbH, Bremen) als *E. coli* und somit als STEC bzw. EHEC identifiziert wurden. Da das MALDI-TOF-MS-Verfahren keine Differenzierung zwischen *E. coli* und *Shigella* spp. ermöglicht, gelangen hierfür ausschließlich Kolonien mit *E. coli*-typischer Morphologie (Fuchsinglanz auf Endo-Agar) zur Untersuchung. Die Isolate wurden zudem molekularbiologisch auf die Virulenzgene für Intimin (*eae*) und Enterohämolysin (*EhlyA*) hin untersucht (REISCHL et al. 2002).

3.2 Serotypisierung

Bei *stx*-positiven Isolaten erfolgte zudem eine Untersuchung bezüglich der *E. coli*-Serogruppe O157. War das Ergebnis der Objektträgeragglutination mittels Anti-O157-Kaninchenserum positiv folgten die Bestätigung durch eine konventionelle O157-PCR (DESMARCHELIER et al. 1998; KARCH, persönliche Mitteilung) und die Bestimmung der Beweglichkeit mittels hängendem Tropfen. Hiernach wurden die Isolate zur endgültigen Serotypisierung an das *NRZ für Salmonellen und andere Enteritiserreger* (RKI, Wernigerode) geschickt. Hierzu wurden Reinkulturen von Endo-Agar-Platten in das Transportmedium überimpft. Da es sich bei diesen STEC-Kulturen um ansteckungsgefährliche Stoffe der Klasse 6.2, Kategorie B handelt (diagnostische Proben; UN 3373), erfolgte der Versand als biologischer Stoff gekennzeichnet und entsprechend den Anforderungen verpackt. Die Serotypisierung der Isolate aus Tierkotproben und Schlachtkörperproben erfolgte im *NRL für E. coli* (BfR, Berlin).

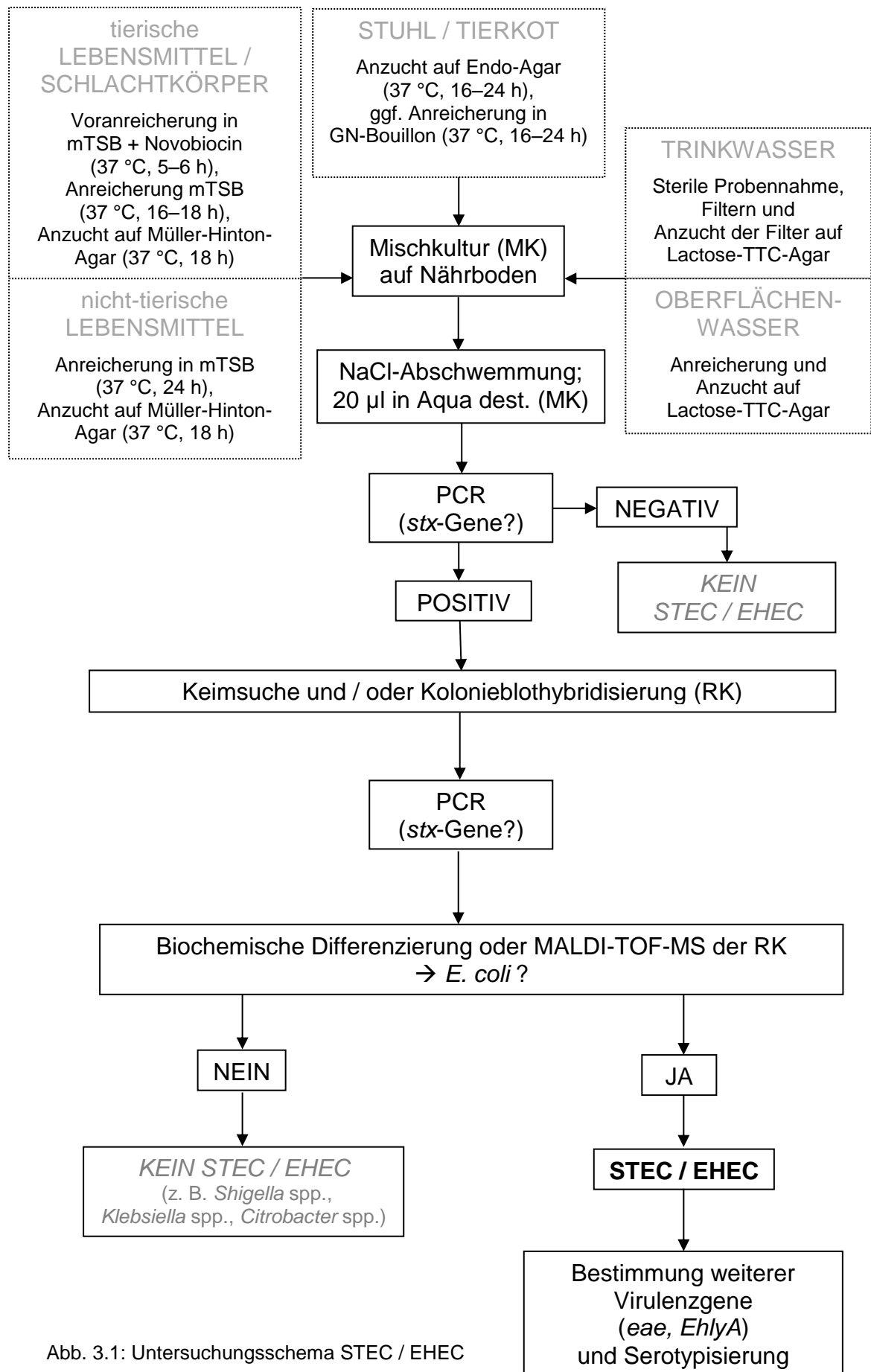


Abb. 3.1: Untersuchungsschema STEC / EHEC

3.3 Lagerung und Aufbereitung von Isolaten (Stammhaltung)

Um eine spätere Rekultivierung der Isolate zu ermöglichen, wurden ausdifferenzierte Reinkulturen mittels sterilem Tupfer von der Endo-Agar-Platte abgenommen, in Kryoröhrchen eingerieben und bei $-80 \pm 5^\circ\text{C}$ tiefgefroren. Hierbei wurde unter der Sterilwerkbank und streng nach Angaben des Herstellers vorgegangen (CryobankTM, Mast Diagnostica).

Die in dieser Studie verwendeten Isolate wurden aus solchen tiefgefrorenen Kryoröhrchen heraus auf Endo-Agar ausgestrichen und für 16 bis 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Die DNA der fünf Referenzstämme wurde anschließend extrahiert (siehe Abschnitt 3.5.1.). Um die DNA aller weiteren Isolate freizusetzen, wurden ein bis zwei Kolonien der Reinkultur in 400 µl steriles Wasser überführt und bei 95°C für 15 Minuten gekocht. Für die Bestimmung der Inklusivität wurde die DNA-Konzentration (c_{DNA}) der gekochten Bakterienlösungen im Spektralphotometer bestimmt und unter Zugabe von sterilem Wasser auf 1 ng/µl eingestellt (siehe hierzu Abschnitt 3.6.2.).

3.4 Bakterienstämme

Alle verwendeten Bakterienstämme gehören zur Stammsammlung des LGL, Oberschleißheim, und wurden entsprechend der beschriebenen Methoden angezüchtet, extrahiert oder bei 95°C gekocht und im Anschluss molekularbiologisch untersucht.

3.4.1 STEC-Referenzstämme

Tab. 3.1: STEC-Referenzstämme der PCR-Etablierung

Serovar	Jahr	LGL-Nummer	Biochemische Differenzierung	Virulenzgene			
				<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>EhlyA</i>
O26:H11	2010	16781-001-01 -4 1K	<i>E. coli</i>	-	+	+	+
O103:H2	2010	88175-001-01 -2 1K	<i>E. coli</i>	+	-	+	+
O111:H-	2008	47917-001-01 -4 1K	<i>E. coli</i>	+	-	+	+
O145:H-	2008	51822-001-01 -5 1K	<i>E. coli</i>	-	+	+	+
O157:H-	2010	74955-001-01 -1 1K	<i>E. coli</i>	-	+	+	+

Die Referenzstämme dienten als externe Positivkontrollen bzw. wurden zur Bestimmung der Nachweisgrenzen eingesetzt.

3.4.2 Bakterienstämme zur Selektivitätsbestimmung

Die Bestimmung der Selektivität umfasst sowohl die Auswertung korrekt positiver und falsch negativer Messergebnisse in Bezug auf die Zielkeime der Real-Time PCR (Inklusivität) als auch die Auswertung korrekt negativer und falsch positiver Messergebnisse in Bezug auf nicht-Zielkeime der Real-Time PCR (Exklusivität).

3.4.2.1 Inklusivitätsbestimmung

Es wurden jeweils 50 *E. coli*-Stämme der Serogruppen O26, O103, O145, O157 sowie alle 25 in der Stammsammlung des LGL, Oberschleißheim, vorhandenen *E. coli*-Stämme der Serogruppe O111 untersucht ($C_{DNA} = 1 \text{ ng/}\mu\text{l}$; siehe Anhang 8.2, Tabellen 8.10a bis 8.10e).

3.4.2.2 Exklusivitätsbestimmung

DNA-Isolate von 44 verschiedenen Bakterienstämmen der Familie *Enterobacteriaceae* (PAVLOVIC et al. 2010 sowie Stämme des LGL, Oberschleißheim) und 95 Stämme unterschiedlicher Serogruppen der Spezies *E. coli* wurden zur Erfassung der Exklusivität eingesetzt ($C_{DNA} = 1 \text{ ng/}\mu\text{l}$). Siehe hierzu Tabelle 4.7 und Anhang 8.2 Tabelle 8.11.

3.5 *Stx*-negative humane Stuhlproben

Zudem wurden 100 Mischkulturen aus humanen Stuhlproben mit negativem *stx*-Ergebnis (Anhang 8.2, Tabelle 8.12) mittels Real-Time PCR auf das Vorhandensein der Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157 hin untersucht (Zielgene siehe Tabelle 3.3). Hierfür wurden 20 μl der aus der Routinediagnostik vorliegenden NaCl-Abschwemmung - wie in Abschnitt 3.1 beschrieben - in 400 μl steriles Wasser überpipettiert, gemischt und bei 95 °C gekocht. 2 μl dieser DNA-Lösung wurden anschließend mittels der Pentaplex EcS-PCR (Pentaplex *E. coli*-Serogruppen-PCR) untersucht. Bei positivem PCR-Ergebnis erfolgte die Keimsuche, wobei zunächst ein fraktionierter Ausstrich der betroffenen NaCl-Abschwemmung auf Endo-Agar angefertigt und wie bereits

beschrieben bebrütet wurde. Mit einer sterilen Metallnadel wurden im Anschluss fünf morphologisch charakteristische Einzelkolonien aufgenommen und durch Einreiben in 200 µl NaCl-Lösung gepoolt (insgesamt fünf Pools je positiver Mischkultur; n = 25). 20 µl der jeweiligen Bakterienlösung wurden in 400 µl steriles Wasser überführt, gemischt, gekocht und erneut mittels PCR untersucht. Die weitere Keimsuche erfolgte in Abhängigkeit vom gemessenen C_t-Wert (Cycle threshold; PCR-Zykluszahl, bei der das zu messende Fluoreszenzsignal erstmals über die definierte Hintergrundfluoreszenz ansteigt). Lag der C_t-Wert < 25 wurden 25 Einzelkolonien abgenommen, lag er > 25 wurden zuerst wiederum fünf Pools à fünf Einzelkolonien hergestellt. Je positiver Mischkultur wurden so mindestens 50 Einzelkolonien untersucht.

3.6 Molekularbiologische Methoden

3.6.1 Extraktion von Referenz-DNA aus bakteriellen Reinkulturen

Die Extraktion der bakteriellen DNA erfolgte unter Verwendung eines Extraktionskits (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics GmbH; VOGELSTEIN und GILLESPIE 1979) nach Angaben des Herstellers. Ausgangsmaterial waren auf Endo-Agar angewachsene Bakterienreinkulturen. Es wurde ein Blindwert ohne Zugabe von Koloniematerial als Extraktionskontrolle mitgeführt. Das Prinzip der DNA-Extraktion lässt sich wie folgt zusammenfassen: Nach Aufschluss der bakteriellen Zellwand wird die freigesetzte DNA an die Silikamembran des Filtergefäßes gebunden, gereinigt, wieder gelöst und im Sammelgefäß aufgefangen. Wichtige Komponenten sind hierfür die im Binding Buffer des Extraktionskits enthaltenen chaotropen Salze (Guanidin-HCl), welche zum einen die Bindung der DNA an die Silikamembran vermitteln und zum anderen DNA-schädigende Nukleasen rasch denaturieren (N.N. 2012a). Anschließend wurde die Konzentration der extrahierten DNA photometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 3.5.2) und die DNA-Lösung sofort eingesetzt bzw. zur weiteren Verwendung bei - 20 ± 3 °C tiefgefroren.

3.6.2 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung

Um gewünschte DNA-Konzentrationen oder Verdünnungsreihen zu erstellen, musste zunächst die DNA-Konzentration des Ausgangsmaterials (Isolate der Stammsammlung, siehe 3.4) bestimmt werden. Hierzu wurde ein Spektralphotometer (NanoDrop™ ND-1000, Peqlab) nach Angaben des Geräteherstellers mit 1,5 µl sterilem Wasser kalibriert und anschließend ein Blindwert mit der gleichen Menge Lösungsflüssigkeit eingestellt. Bei gekochter DNA-Lösung diene steriles Wasser als Lösungsflüssigkeit, bei extrahierter der Elution Buffer des oben genannten Extraktionskits. Je Isolat wurden 1,5 µl der DNA-Lösung vermessen. Die DNA-Konzentration ergibt sich hierbei aus der Absorptionsmessung. Grundlage der Berechnung ist die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260} oder A_{260}): Ergibt die A_{260} einen Wert von 1 entspricht das einer Konzentration an doppelsträngiger DNA von 50 µg/ml (PÖPPING und UNTERBERGER 2010). Die spektrophotometrische Untersuchung lässt zusätzlich zur quantitativen auch eine qualitative Beurteilung der Probe zu. Extrahierte DNA-Lösungen sollten keine Verunreinigungen durch Proteine oder Lösungsmittel aufweisen, was sich anhand der Absorptionsquotienten A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} darstellen lässt. Diese sollten bei Werten im Bereich von 1,8 bis 2,0 bzw. 1,8 bis 2,2 liegen (BOGNER und KILLEEN 2006; N.N. 2010). Jede der Messungen wurde zweifach durchgeführt und ein Mittelwert der DNA-Konzentration errechnet. Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration der Lösung durch Verdünnung auf 1 ng/µl für die Bestimmung der Inklusivität bzw. PCR-Kontrollen oder 10 ng/µl für Verdünnungsreihen eingestellt.

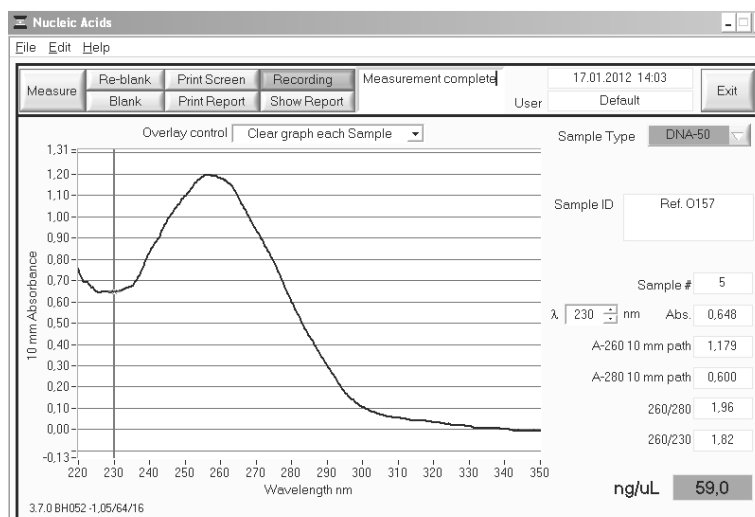


Abb. 3.2:
Spektrophotometrische
Messung am Beispiel
der extrahierten DNA
des *E. coli* O157-
Referenzstammes
($C_{DNA} = 59 \text{ ng/}\mu\text{l}$;
die o. g. Absorptions-
quotienten liegen im
Referenzbereich).

3.6.3 Etablierung der Real-Time PCR zum Nachweis der *E. coli*-Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157 (EcS-PCR; *E. coli*-Serogruppen-PCR)

Zur Detektion der fünf *E. coli*-Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157 in *E. coli*-Isolaten, die wie in Abschnitt 4.2.1 ausgeführt zu den am häufigsten nachgewiesenen Serogruppen bei bayerischen EHEC-Infektionen gehören, wurden im Rahmen dieser Studie fünf Singleplex Real-Time PCR-Systeme und durch Kombination der Systeme ein Pentaplex Real-Time PCR-System etabliert. Für die Etablierung wurden Isolate des LGL, Oberschleißheim, aus humanen Stuhlproben, Lebensmittel- und Schlachtkörperproben sowie Wasser- und Tierkotproben eingesetzt. Dabei wurde soweit vereinbar nach den Vorgaben der Normen ISO 22118:2011 und ISO 22119:2011 vorgegangen. Die Norm ISO 22118:2011 definiert die Leistungsmerkmale einer qualitativen, Real-Time PCR-basierten Nachweismethode in Bezug auf lebensmittelassoziierte Pathogene. Die Validierung sollte Auskunft über die Sensitivität und Selektivität einer qualitativen Nachweismethode geben. Die Norm ISO 22119:2011 erläutert Definitionen und allgemeine Anforderungen an eine Real-Time PCR-basierten Nachweismethode in Bezug auf lebensmittelassoziierte Pathogene (z. B. Begriffsdefinitionen oder welche Reagenzien und Geräte eingesetzt werden dürfen). Abweichungen von den oben genannten ISO-Normen werden im Folgenden diskutiert.

Die Zusammensetzung der Reagenzien für die Single- und Pentaplex PCR-Systeme dieser Studie erfolgte entsprechend der Angaben des Kit-Herstellers (QuantiTect® Multiplex RT-PCR NoRox Kit, Qiagen). Primer- und Sondenlyophilisate wurden unter Zugabe von Wasser (PCR grade entsprechend der Norm ISO 22119:2011) nach Angaben des jeweiligen Herstellers auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt, aliquotiert und bei – 20 °C tiefgefroren. Bei Bedarf wurden hieraus Arbeitslösungen (c = 10 pmol/µl) erstellt und ebenfalls aliquotiert tiefgefroren. Zur Verwendung wurde die Arbeitslösung im Kühlschrank aufgetaut und bis zum Verbrauch bei 4 °C ± 2 aufbewahrt. Die Sequenzen der Primer und Sonden (PERELLE et al. 2004, 2005) sowie die verwendeten Farbstoffe und Quencher sind in den Tabellen 3.3 und 8.1 im Anhang dargestellt.

Für eine bessere Detektion der PCR-Produkte wurde die Sondensequenz für das *wzx*_{O103}-Gen am 5'-Ende um insgesamt neun Basen verlängert (siehe Tabelle 3.3).

Für alle PCR-Systeme wurden unter der Sterilwerkbank 18 µl Mastermix und 2 µl DNA-Lösung je Ansatz in das Well einer Mikrotiterplatte pipettiert. Das gesamte Ansatzvolumen betrug somit 20 µl. Die Mikrotiterplatte wurde vor dem Einsatz in das PCR-Gerät (Mx3000P™ bzw. Mx3005P™, Agilent Technologies) mittels Folie verschlossen und abzentrifugiert. Entsprechend der Vorgabe der Norm ISO 22118:2011 wurden stets PCR-Doppelansätze vermessen.

Tab. 3.2: Temperaturprofil der EcS-PCR

	Temperatur	Dauer
Prädenaturierung:	95 °C	15 Minuten
45 Zyklen:	94 °C	1 Minute
	60 °C	1 Minute (Quantifizierung)

3.6.3.1 Sondensystem

Die Analyse serogruppenspezifischer Gene aus *E. coli*-Kulturen erfolgte mittels **Hydrolysesonden** (Taqman®). Dieses Sondensystem trägt neben dem signalgebenden Fluorochrom (Donor) auch einen Quencher (Akzeptor). Die vom Donor emittierte Fluoreszenz hat eine Wellenlänge, welche vom Messgerät registriert wird, aber auch das Absorptionsspektrum des Quenchers liegt im Bereich des Emissionsspektrums des Donors. Wird die Mastermix-DNA-Lösung nun einer anregenden Lichtquelle ausgesetzt, emittiert das Donor-Fluorochrom Fluoreszenz einer bestimmten Wellenlänge.

So lange sich der Quencher in räumlicher Nähe zum Donor befindet wird die Fluoreszenz absorbiert, weshalb kein Signal messbar ist (Fluoreszenzresonanz-Energietransfer, FRET; Abb. 3.3).

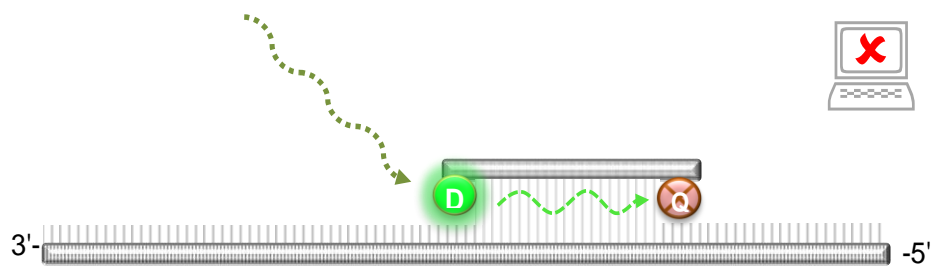


Abb. 3.3: Prinzip Hydrolyseprobe I

Die hierbei eingesetzten „Dark Quencher“ geben die aufgenommene Fluoreszenzenergie als Wärme ab und verursachen somit kein eigenes Fluoreszenzsignal (N.N. 2012b). Während der Elongationsphase der Real-Time PCR verlängern DNA-Polymerasen die Primersequenzen komplementär zur Matrix-DNA. Treffen sie dabei auf die Hydrolyseprobe wird diese aufgrund der 5′-3′-Exonukleaseaktivität gespalten, Donor und Quencher werden räumlich getrennt und die Unterdrückung des Fluoreszenzsignals ist aufgehoben (Abb. 3.4).

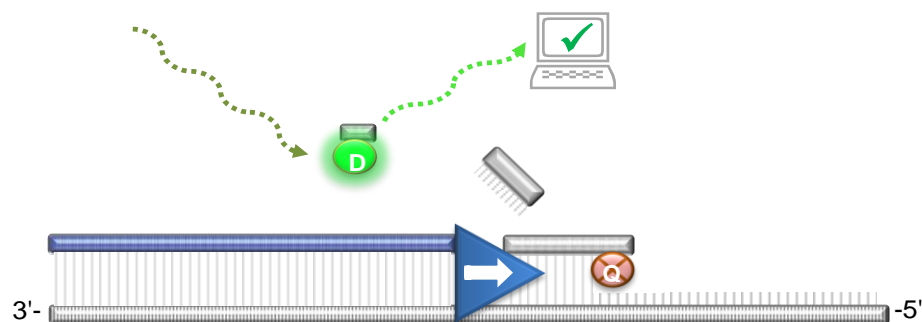


Abb. 3.4: Prinzip Hydrolyseprobe II

Tab. 3.3: Sequenzen der Primer und Sonden der Real-Time PCR zum Nachweis der *E. coli*-Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157

Bezeichnung		Gen	Sequenz (5'-3')	Literatur
Primer	O26-F	wzx	CGCGACGGCAGAGAAAATT	Perelle et al. (2004)
	O26-R		AGCAGGCTTTTATATTCTCCAACCTT	
Sonden	O26-p (FAM)		[FAM]-CCCCGTAAATCAATACTATTTACGAGGTTGA-[BHQ1]	
	O26-p (Atto 425)		[ATTO 425]-CCCCGTAAATCAATACTATTTACGAGGTTGA-[DDQ-1]	
Primer	O103-F	wzx	CAAGGTGATTACGAAAATGCATGT	Perelle et al. (2005)
	O103-R		GAAAAAAGCACCCCCGTACTTAT	
Sonde	O103-p		[HEX]- ATTATCCTT CATAGCCTGTTGTTTTAT-[BBQ]	modifiziert nach Perelle et al. (2005)
Primer	O111-F	wbdI	CGAGGCAACACATTATATAGTGCTTT	Perelle et al. (2004)
	O111-R		TTTTTGAATAGTTATGAACATCTTGTTTAGC	
Sonde	O111-p		[Cy5]-TTGAATCTCCCAGATGATCAACATCGTGAA-[BBQ]	
Primer	O145-F	ihp1	CGATAATATTTACCCACACAGTACAG	Perelle et al. (2004)
	O145-R		GCCGCCGCAATGCTT	
Sonde	O145-p		[Texas Red]-CCGCCATTCAGAATGCACACAATATCG-[BBQ]	
Primer	O157-F	rfbE	TTTCACACTTATTGGATGGTCTCAA	Perelle et al. (2004)
	O157-R		CGATGAGTTTATCTGCAAGGTGAT	
Sonde	O157-p		[FAM]-AGGACCGCAGAGGAAAGAGAGGAATTAAGG-[BHQ1]	

3.6.3.2 Kontrollen

Als positive PCR-Kontrolle wurde DNA-Lösung des jeweiligen Referenzstammes (siehe Abschnitt 3.4.1.; $c_{\text{DNA}} = 1 \text{ ng}/\mu\text{l}$) eingesetzt. Als Non Template Control (Blindwert) diente ein Doppelansatz mit je 2 μl Wasser (PCR grade) anstelle der Proben-DNA. Bei extrahierter DNA wurde zudem eine negative Extraktionskontrolle mitgeführt.

3.6.3.3 Singleplex PCR-Systeme

Das Pipettierschema der Singleplex EcS-PCR ist hier beispielhaft für den Nachweis der Serogruppe O26 dargestellt (Tabelle 3.4). Abgesehen von den jeweils eingesetzten Primerpaaren und Sonden entspricht es den Schemata zum Nachweis der *E. coli*-Serogruppen O103, O111, O145 und O157. Für den Nachweis der *E. coli*-Serogruppe O26 wurde in der Singleplex PCR eine FAM-markierte Hydrolysesonde eingesetzt.

Tab. 3.4: Reagenzien der Singleplex Real-Time PCR (O26)

			je Einzelansatz in μl
QuantiTect® Multiplex PCR NoRox Kit (Qiagen)			10
Wasser (PCR grade)			6,8
Primer	O26-F O26-R	jeweils	0,4
(c = 0,2 μM)			
Sonden	O26-p (FAM)		0,4
(c = 0,2 μM)			
Gesamtvolumen je Einzelansatz			18
DNA-Lösung			2

3.6.3.4 Pentaplex PCR-System

Im Folgenden ist das Pipettierschema der Pentaplex EcS-PCR dargestellt. Für den Nachweis der Serogruppe O26 wurde hierbei eine ATTO 425-markierte Hydrolysesonde verwendet.

Tab. 3.5: Reagenzien für Pentaplex Real-Time PCR

		je Einzelansatz in μl	
QuantiTect® Multiplex PCR NoRox Kit (Qiagen)			10
Wasser (PCR grade)			2
Primer	O26-F O26-R O103-F O103-R O111-F O111-R O145-F O145-R O157-F O157-R (c = 0,2 μM)	jeweils	0,4
Sonden	O26-p (ATTO 425) O103-p O111-p O145-p O157-p (c = 0,2 μM)	jeweils	0,4
Gesamtvolumen je Einzelansatz			18
DNA-Lösung			2

3.6.3.5 Sensitivität

Die Nachweisgrenzen aller EcS-PCR-Systeme wurden anhand von Verdünnungsreihen mit DNA der Referenzstämme (siehe 3.4.1.) ermittelt. Die extrahierte bakterielle DNA war zuvor spektralphotometrisch vermessen und auf eine DNA-Konzentration von 10 ng/ μl eingestellt worden. Dabei wurde Kalbsthymus-DNA-Lösung (Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 100 ng/ μl als Verdünnungslösung verwendet, um unspezifische Bindungen der Referenz-DNA an das Reaktionsgefäß zu verhindern.

3.6.3.5.1 Dezimale Verdünnungsreihen in Thymus-DNA-Lösung

Es wurden sieben Verdünnungsstufen der Referenz-DNA (c_{DNA} von 1 ng/ μl bis 1 fg/ μl) erstellt. Jeweils 90 μl der oben genannten Kalbsthymus-DNA-Lösung wurden in sieben Reaktionsgefäßen vorgelegt. Anschließend wurden 10 μl der Referenz-DNA ($c_{\text{DNA}} = 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$) in das erste Reaktionsgefäß pipettiert, gründlich gemischt und abzentrifugiert. Aus dieser ersten Verdünnungsstufe ($V1 = 1 \text{ ng}/\mu\text{l}$) wurden nun mit einer neuen Pipettenspitze 10 μl entnommen und in das zweite Reaktionsgefäß ($V2 = 100 \text{ pg}/\mu\text{l}$) überpipettiert, ebenfalls gemischt und abzentrifugiert. Auf gleiche Weise wurden die weiteren Verdünnungsstufen bis einschließlich V7 (1 fg/ μl) erstellt.

Die in der jeweiligen Verdünnungsstufe enthaltenen *E. coli*-Genomkopien wurden anhand folgender Angaben errechnet: Die Genomgröße von *E. coli* beträgt mindestens $4,64 \times 10^6 \text{ bp}$ (SCHEUTZ und STROCKBINE 2005). Ein Basenpaar (bp) hat ein Molekulargewicht von 649 Da, wobei 1 Dalton umgerechnet $1,6605388628 \times 10^{-27} \text{ kg}$ wiegt (BIPM 2006).

Das Molekulargewicht des doppelsträngigen *E. coli*-Genoms beträgt also

$$4,64 \times 10^6 \text{ bp} \times 649 \text{ Da} = 3011360000 \text{ Da} / E. coli\text{-Genom}.$$

Dieses Ergebnis lässt sich anhand der oben genannten Angaben nun weiter in das *E. coli*-Genomgewicht umrechnen

$$\begin{aligned} & 3011360000 \text{ Da} \times 1,6605388628 \times 10^{-27} \text{ kg} \\ &= 5,00048 \times 10^{-18} \text{ kg} / \text{Genom} \\ &= 5,00048 \times 10^{-12} \text{ mg} / \text{Genom} \\ &= 5,00048 \times 10^{-9} \text{ }\mu\text{g} / \text{Genom} \\ &= 5,00048 \times 10^{-6} \text{ ng} / \text{Genom} \\ &= 5,00048 \times 10^{-3} \text{ pg} / \text{Genom} \\ &= 5,00048 \text{ fg} / \text{Genom} \end{aligned}$$

Somit ergibt sich ein Gewicht von rund 5 fg pro *E. coli*-Genom.

Tab. 3.6: Dezimale Verdünnungsreihe

Verdünnungsstufe	C _{DNA}	<i>E. coli</i> -Genomkopien
V1	1 ng	200000
V2	100 pg	20000
V3	10 pg	2000
V4	1 pg	200
V5	100 fg	20
V6	10 fg	2
V7	1 fg	0,2

Die Verdünnungsreihe wurde hiernach sofort mittels Real-Time PCR analysiert. Aliquots der Ausgangslösung ($c_{\text{DNA}} = 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$) wurden bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3$ zur weiteren Verwendung tiefgefroren.

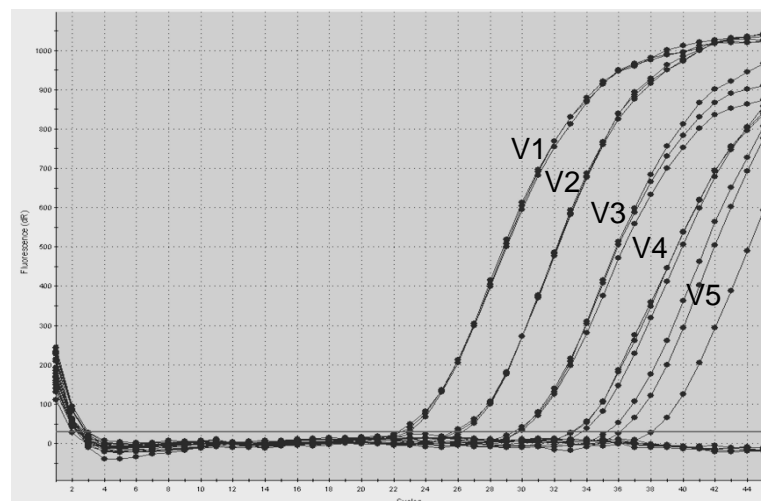


Abb. 3.5: Verdünnungsreihe O103-Singleplex PCR-System (V1 = 1 ng/ μl bis V7 = 1 fg/ μl ; Dreifachansatz). Das PCR-System weist die Verdünnungsstufen V1 bis V5 vollständig nach, die Verdünnungsstufen V6 und V7 hingegen nicht.

3.6.3.5.2 Bestimmung der Nachweisgrenzen

Drei Replikate je Verdünnungsstufe wurden in einer Mikrotiterplatte mittels Singleplex sowie Pentaplex EcS-PCR analysiert. Anhand der Messergebnisse wurden Standardkurven zur Bestimmung der PCR-Effizienz und des R^2 -Wertes erstellt. Die Effizienz errechnet sich dabei anhand der Steigung (slope) der Standardkurve nach folgender Formel:

$$\text{PCR-Effizienz in \%} = (10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$$

Eine PCR-Effizienz von 100 % bedeutet, dass mit jedem Amplifikationszyklus eine Verdoppelung der PCR-Produkte erreicht wird. Dies ist gegeben, wenn die Steigung der Standardkurve bei - 3,32 liegt, das heißt, wenn sich die Anzahl der PCR-Produkte innerhalb von 3,32 PCR-Zyklen verzehnfacht (STEPHENSON 2010). Die PCR-Effizienz sollte im Bereich von 90 bis 110 % liegen. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) beschreibt die Nähe der gemessenen Datenpunkte zur Regressionsgeraden und ermöglicht Rückschlüsse auf die Reproduzierbarkeit der PCR-Analyse; R^2 sollte $\geq 0,98$ betragen (NOLAN et al. 2007). Als Nachweisgrenze oder Limit of Detection (LOD) galt die DNA-Konzentration, bei der alle drei Replikate ein positives Messergebnis aufwiesen (in Anlehnung an ISO 22118:2011).

Da insgesamt drei unabhängige Verdünnungsreihen basierend auf separat extrahierter Referenzstamm-DNA vermessen wurden, beträgt die Anzahl der untersuchten Einzelansätze $n = 9$. Aus diesen neun Messungen wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung errechnet. Anhand der Nachweisgrenze ließ sich die Anzahl der gemessenen Genomkopien bestimmen, welche in einem PCR-System zuverlässig detektiert wird.

3.6.3.6 Präzision und Richtigkeit

Die Präzision dient der Beurteilung der Reproduzierbarkeit eines Nachweisverfahrens anhand von voneinander unabhängigen Messungen. Zum Ermessen der Präzision wurden dezimale Verdünnungsreihen erstellt und dreimal an zwei aufeinander folgenden Tagen mittels Real-Time PCR analysiert. Aus den gemessenen C_t -Werten aller Replikate je Verdünnungsstufe ($n = 6$) wurden ein Mittelwert sowie die Standardabweichung und der jeweilige Variationskoeffizient berechnet. Die Berechnungen erfolgten nur, wenn alle sechs Ansätze einer Verdünnungsstufe in der PCR positiv waren. Ansonsten wurde die Verdünnungsstufe nicht gewertet (No C_t). Die Richtigkeit gibt Auskunft darüber, wie nah ein Testergebnis am wahren Wert liegt bzw. zeigt Abweichungen aufgrund eines systematischen Fehlers an. Hierfür wurde der jeweilige *E. coli*-Referenzstamm im Rahmen der Inklusivitätsbestimmung als Referenzwert in jeder Messung mitgeführt.

3.7 Datenauswertung und Statistik

Zur Auswertung der Labordaten der Jahre 2009 bis 2011 wurden Laborbücher und das elektronische *Labor-Information- und Management-System (LIMS)* des EHEC-Labors im LGL, Oberschleißheim, herangezogen. Die Auswertung der Serotypisierungen von September 2004 bis Dezember 2011 beruht auf den Ergebnissen des RKI, Wernigerode, sowie des BfR, Berlin. Die Auswertung dieser Daten und der Ergebnisse der PCR-Etablierung erfolgte nach den Methoden der beschreibenden und schließenden Statistik.

IV ERGEBNISSE

4.1 Vergleichende Auswertung der Untersuchungsdaten 2009 bis 2011

Insgesamt wurden 2009 bis 2011 8272 humane Proben (vorwiegend Stuhlproben), 1522 Lebensmittel-, 69 Schlachtkörper-, 240 tierische Kot- und 29 Wasserproben durch das LGL, Oberschleißheim, molekularbiologisch auf das Vorhandensein von *stx*-Genen hin untersucht. Nicht berücksichtigt sind in dieser Auswertung Proben ohne Wachstum auf Nähragar bzw. nach Anreicherung.

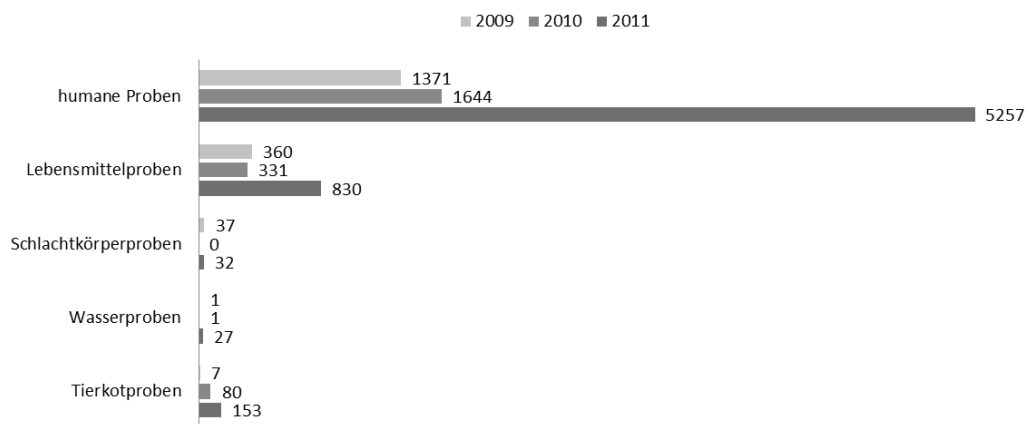


Abb. 4.1: Probenaufkommen STEC-Diagnostik im LGL, Oberschleißheim (Anzahl 2009 bis 2011).

4.1.1 Humane Proben

Während im Jahr 2009 1371 und im Jahr 2010 1644 humane Proben in Bezug auf EHEC untersucht wurden, waren es 2011 - bedingt durch den EHEC-Ausbruch im Mai - insgesamt 5257 Proben. Der **Anteil an Erstfällen** mit *stx*-positivem Ergebnis (Mischkultur, MK) betrug 2009 6,0 % (82 Fälle), 2010 7,6 % (124 Fälle) und 2011 6,8 % (356 Fälle). Als Erstfall gilt hierbei die erste im Rahmen der EHEC-Untersuchung eingesandte Probe eines Patienten mit *stx*-positivem Ergebnis. Folgeuntersuchungen werden nicht zu den Erstfällen gezählt. Für eine Auflistung der Probenmaterialien siehe Anhang 8.2, Tabelle 8.2.

Insgesamt überwiegt der Anteil *stx1*-positiver Mischkulturproben (44,3 %) in den Jahren 2009 bis 2011, gefolgt von *stx2*-positiven Proben (36 %; Angabe exklusive des Ausbruchsstammes von 2011) und *stx1/stx2*-positiven Proben (19,7 %). Siehe hierzu auch Abbildung 4.2.

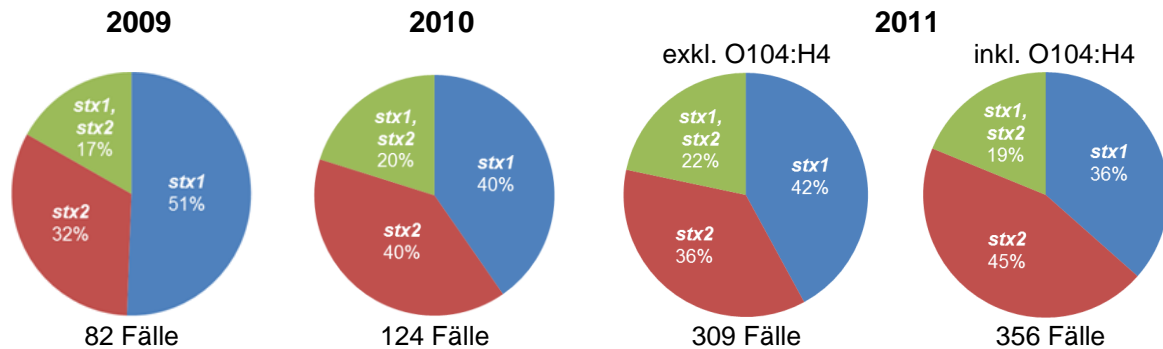


Abb. 4.2: Verteilung der *stx*-Gene in *stx*-positiven, humanen Mischkulturen (Erstfälle 2009 bis 2011). 2011 wurden insgesamt 47 O104:H4-Fälle nachgewiesen.

2009 konnte in 85,4 % der Erstfälle (70 Fälle), 2010 in 81,3 % (100 Fälle) und 2011 in 69,1 % (246 Fälle) ein Isolat gewonnen werden. Da 2011 aus einer humanen Stuhlprobe zwei unterschiedliche *E. coli*-Stämme isoliert wurden, sind es in diesem Jahr insgesamt 247 Erstfall-Isolate aus 246 Erstfällen. Die **Verteilung der Virulenzgene** in 370 Erstfall-Isolaten, d.h. in allen Isolaten der drei Jahre exklusive derer des Ausbruchsstammes, ergab, dass der überwiegende Anteil das *stx1*-Gen (46,5 %; 172 Isolate), 34,9 % das *stx2*-Gen (129 Isolate) und 18,6 % (69 Isolate) beide *stx*-Gene in sich trugen. In lediglich 24,9 % (92) dieser Isolate wurden ausschließlich *stx*-Gene gefunden. In 5,7 % wurde zudem das *eae*-Gen alleine, in 30 % das *EhlyA*-Gen alleine und in 39,4 % eine Kombination von *eae* und *EhlyA* nachgewiesen (21, 111 bzw. 146 Isolate). Anders zusammengefasst trugen insgesamt 45,1 % (167) der STEC-Isolate das *eae*-Gen und 69,4 % (257) das *EhlyA*-Gen. Unter den verschiedenen, möglichen Konstellationen der vier gesuchten Virulenzgene gehörten *stx1*, *eae*, *EhlyA* und *stx2*, *eae*, *EhlyA* zu den häufigsten in diesen drei Jahren (18,9 % bzw. 15,4 %).

Die 47 Isolate des Ausbruchsstammes EHEC O104:H4 von 2011 waren allesamt *stx2*-positiv sowie *eae*- und *EhlyA*-negativ. Für nähere Angaben zu den einzelnen Jahren siehe Abbildung 4.3 und Tabelle 8.3 im Anhang.

ERGEBNISSE

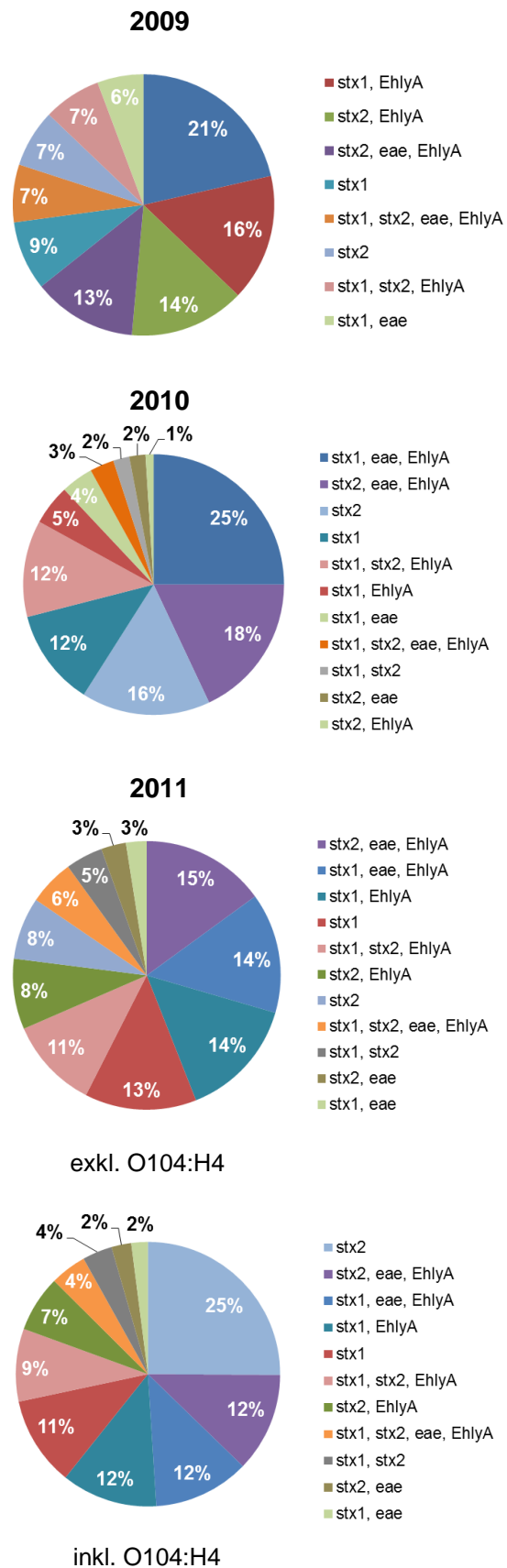


Abb. 4.3: Verteilung der Virulenzgene humaner EHEC-Isolate

Während EHEC- und HUS-Erkrankungen mit saisonalen Schwankungen über das ganze Jahr verteilt auftreten, beschränkte sich der Ausbruch des Erregerstammes EHEC O104:H4 im Jahr 2011 auf einige Wochen. In Bayern begann er - aus analytischer Sicht des LGL, Oberschleißheim - mit der ersten positiven Probeneinsendung am 31.05.2011 und endete fast zwei Monate später mit der letzten bestätigten Neuinfektion am 25.07.2011. Bei 47 Personen konnte der Ausbruchsstamm nachgewiesen und isoliert werden. 45 der infizierten Personen hatten ihren Wohnort in Bayern. Zwei befanden sich zum Zeitpunkt der Diagnose in Bayern und werden deshalb im Folgenden als bayerische Fälle in die Auswertung mit eingeschlossen. In Abbildung 4.4 ist die Herkunft und Anzahl der infizierten Personen anhand der Einsendungen aus bayerischen Gesundheitsämtern, Kliniken und Instituten veranschaulicht.

Abb. 4.4:

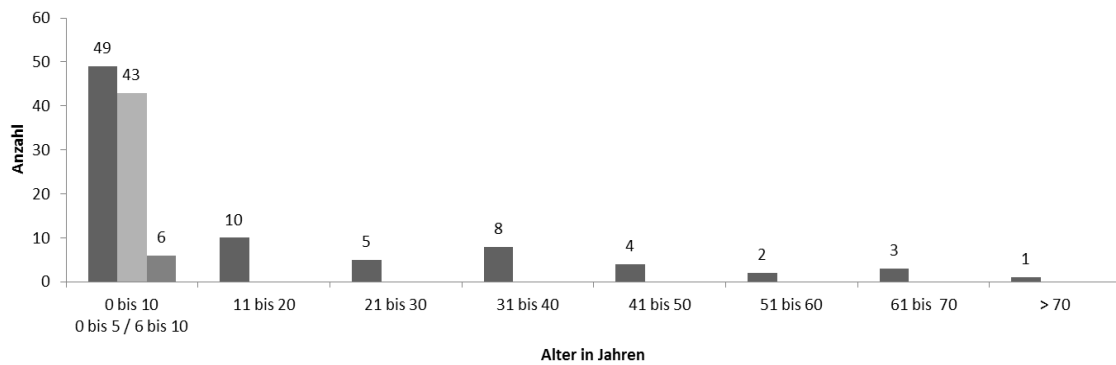
Lokalisation und Anzahl
der bayerischen
O104:H4-Fälle (n = 47).
Kartenvorlage
© Bundesamt für
Kartographie und Geodäsie,
Frankfurt am Main



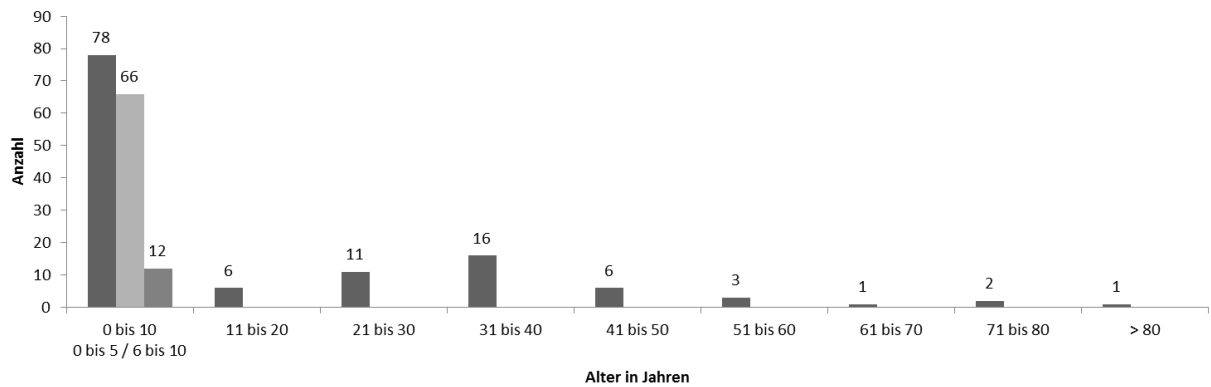
Die **Altersverteilung** der bayerischen EHEC-Betroffenen aus den Jahren 2009 bis 2011 verdeutlicht, dass Kinder besonders empfänglich für EHEC-Infektionen sind. Die unter 1- bis 5-Jährigen sind mit 34,1 % aller Infizierten dieser drei Jahre am stärksten vertreten (siehe Abb. 4.5, exklusive der EHEC O104:H4-Infizierten).

ERGEBNISSE

2009



2010



2011
(exkl. O104:H4)

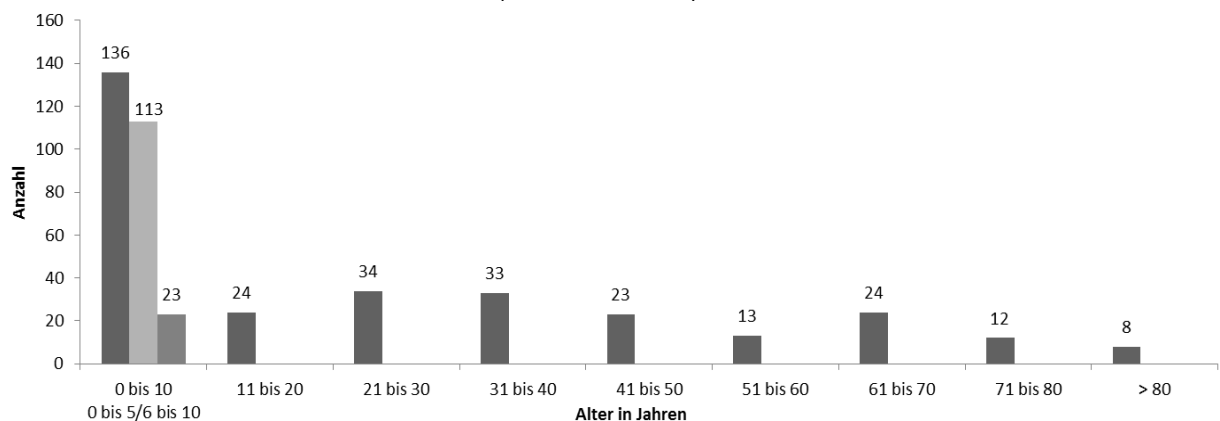


Abb. 4.5: Altersverteilung der Infizierten mit *stx*-positiven Stuhlproben (MK)

2009: n = 82, 2010: n = 124, 2011: n = 307 (zwei der insgesamt 309 MK ohne Altersangaben). Die Gruppe der Infizierten im Alter von unter 1 bis 10 Lebensjahren ist zusätzlich unterteilt in die Altersgruppe von unter 1 bis 5 Lebensjahren (hellgrau) und die Altersgruppe von 6 bis 10 Lebensjahren (mittelgrau). Die Daten zu 2011 zeigen ausschließlich nicht-O104:H4-Fälle.

ERGEBNISSE

2009 machte die Gruppe der unter 1- bis 20-Jährigen 72 % der EHEC-Infizierten aus. Allein der Anteil an Kindern im Alter von unter 1 bis 5 Jahren betrug 41,5 % aller Betroffenen. Der Anteil Erwachsener im Alter von 21 bis 40 bzw. über 40 Jahren liegt bei vergleichsweise niedrigen 15,8 % bzw. 12,2 %. 2010 zeigt sich ein entsprechendes Bild mit 67,7 % EHEC-Infizierten im Alter von unter 1 bis 20 Jahren sowie 21,8 % 21- bis 40-jährigen und 10,5 % über 40-jährigen Betroffenen. Der Anteil *stx*-positiver Kinder im Alter von unter 1 bis 5 Jahren lag 2010 bei 36,3 % aller Infizierten. Das Jahr 2011 unterscheidet sich von den zwei vorangegangenen Jahren. So ist der Anteil der nicht EHEC O104:H4-Infizierten zwischen unter 1 und 20 Jahren mit 52,1 % niedriger als 2009 und 2010, dabei 31,3 % im Alter von unter 1 bis 5 Jahren. Die Gruppe der 21- bis 40-Jährigen beträgt vergleichbare 21,8 %, aber die der über 40-Jährigen ist mit 26,1 % stärker vertreten als in den Vorjahren.

Von dieser an sich EHEC-typischen Altersverteilung unterscheidet sich die breit gefächerte der mit dem Ausbruchsstamm EHEC O104:H4 infizierten Patienten, wie in Abbildung 4.6 dargestellt. Infizierte im Alter von 21 bis 40 Jahren machten mit 34 % den größten Anteil aus, gefolgt von den über 60-Jährigen mit 25,5 %. Die Gruppe der unter 1- bis 20-Jährigen lag bei 21,3 % und die der 41- bis 60-Jährigen bei 19,2 %. Im Alter von unter 1 bis 5 Lebensjahren waren vier Kinder infiziert (8,5 %).

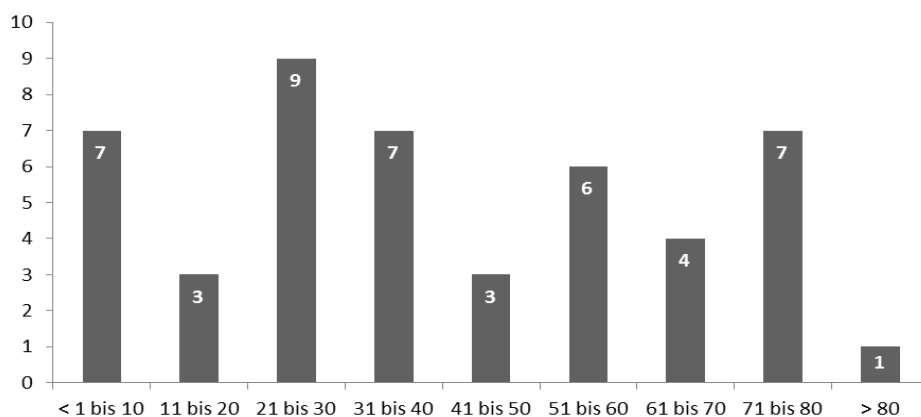


Abb. 4.6: Altersverteilung der EHEC O104:H4-infizierten Patienten in Bayern 2011 (n = 47).

Eine Trennung der Patienten nach **Geschlecht** weist einen höheren Anteil weiblicher Patientinnen auf. Hervorzuheben ist die deutlich erhöhte Anzahl der mit dem Ausbruchsstamm infizierten weiblichen Patientinnen (70,2 %) gegenüber der Anzahl infizierter männlicher Patienten (29,8 %).

Tab. 4.1: Verteilung der EHEC-Erstfälle nach Geschlecht der Patienten in % (Fallzahl)

Jahr	Fallzahl / Jahr	♀	♂
2009	83	51,8 (43)	48,2 (40)
2010	124	54,8 (68)	45,2 (56)
2011 (exkl. O104:H4)	307	58,3 (180)	41,7 (129)
2011 (O104:H4)	47	70,2 (33)	29,8 (14)

4.1.2 Lebensmittel- und Schlachtkörperproben

360 Lebensmittelproben wurden 2009 untersucht, 28 der Proben waren *stx*-positiv (7,8 %; 27 Proben aus tierischen Lebensmitteln sowie eine Probe nicht tierischen Ursprungs). Hieraus konnten 19 STEC-Stämme (67,9 %) isoliert werden, davon 18 tierischen und einer nicht tierischen Ursprungs. 2010 waren es 331 untersuchte Lebensmittelproben (263 tierischen und 67 nicht tierischen Ursprungs; die Herkunft einer Probe war nicht zuzuordnen). Zehn Proben tierischer Herkunft (3 %) waren *stx*-positiv. Hieraus konnten 4 Isolate gewonnen werden. Von den 830 Lebensmittelproben, die 2011 untersucht wurden, waren 377 tierischen Ursprungs und 438 nicht tierischen Ursprungs. Bei insgesamt 15 Proben war die Herkunft nicht eindeutig zuzuordnen. Der *stx*-Nachweis erfolgte bei 21 Proben tierischen Ursprungs (2,5 % aller untersuchten Lebensmittelproben) und es konnten acht Isolate (38 % der *stx*-positiven Proben) gewonnen werden.

Die eingeschickten Proben fallen unter verschiedene Lebensmittelkategorien. Zu den tierischen Lebensmitteln gehören dabei u.a. Fleisch und Fleischerzeugnisse vom Rind, Wildwiederkäuer, Schwein, Wildschwein, Pute, Kaninchen sowie Meeresfrüchte. Zudem Milch und Milcherzeugnisse von Rind, Ziege oder Stute. Nicht tierische Lebensmittel umfassen alle möglichen Obst- und Gemüsesorten von Apfel bis Zwiebel, aber auch Kräuter, Gewürze und Tee.

In der Zeit des EHEC-Ausbruchs 2011 wurden im Rahmen eines Sonderprobenplans zunächst vermehrt Gurken, Tomaten sowie Blattsalate und im weiteren Verlauf dann insbesondere Sprossen und Sprossensamen (v. a. Bockshornkleesaat) untersucht.

In allen drei Jahren waren lediglich 3,9 % (59) der eingesandten Lebensmittelproben *stx*-positiv. 54,2 % der positiven *stx*-Nachweise erfolgten dabei aus Proben von Wiederkäuern (23 Fleischproben und neun Milch-/ Milchproduktproben; siehe hierzu auch Abb. 4.7). *stx2* war in diesem Zeitraum das überwiegend nachgewiesene Virulenzgen (59,3 % der Mischkulturen bzw. 51,6 % der Reinkulturen). In keinem der Lebensmittelisolate konnte das *eae*-Gen nachgewiesen werden, während 38,7 % das *EhlyA*-Gen trugen, was bedeutet, dass in 61,3 % der Isolate ausschließlich *stx*-Gene gefunden wurden. Bis auf eine Probe Melissenblätter aus dem Jahr 2009 (*stx1*, *EhlyA*) waren alle Lebensmittelproben nicht tierischen Ursprungs sowie die Proben unklarer Herkunft im *stx*-Nachweis negativ. Detaillierte Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 4.2 zu finden.

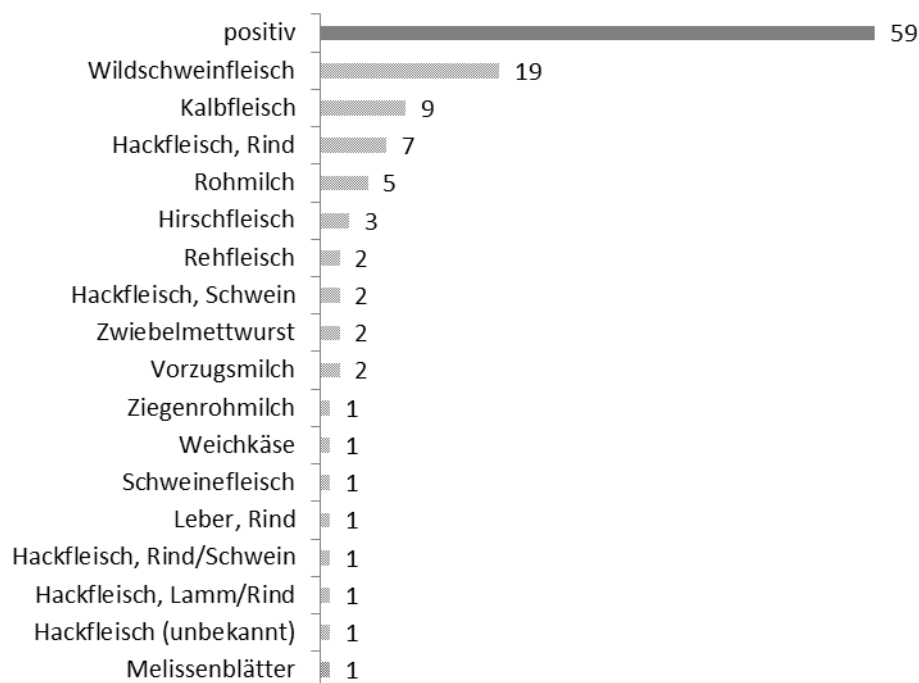


Abb. 4.7: Darstellung der *stx*-positiven Lebensmittelproben (MK; n = 59) 2009 bis 2011 und der Aufteilung des Probenmaterials. Eine einzige dieser Proben war nicht tierischen Ursprungs (Melissenblätter). Aus 31 (52,5 %) der 59 Proben konnten Isolate gewonnen werden.

Von 37 Schlachtkörperproben (Darm, Mastkalb) aus dem Jahr 2009 waren 25 *stx*-positiv (67,6 %) und 15 Keime (60 %) konnten isoliert werden. 2010 erfolgten - entsprechend dem Zoonosen-Stichprobenplan des BfR - keine solchen Probennahmen. 2011 wurden 32 Schlachtkörperproben untersucht (24 Haut/Fett-Proben vom Mastrind und -kalb sowie acht Muskulaturproben vom Mastrind). Zwei der Haut/Fett-Proben und eine Muskulaturprobe waren *stx*-positiv (insgesamt 9,4 %). Ein Isolat konnte gewonnen werden (Mastrind, Haut/Fett; *stx*2, O8:H19).

40,6 % (28) der eingesandten Schlachtkörperproben aller drei Jahre waren *stx*-positiv. In den Mischkulturen waren sowohl *stx*1 als auch *stx*2 mit 35,7 % gleich stark vertreten (je 10 Proben), gefolgt von 28,6 % (8 Proben) mit beiden *stx*-Genen. Die Keimisolierung gelang bei 16 (57,1 %) der 28 *stx*-positiven Mischkulturen und hierbei überwog der Anteil an *stx*1-positiven Isolaten (43,75 %). Insgesamt waren in rund zwei Dritteln (68,75 %) der Isolate ausschließlich *stx*-Gene nachzuweisen. 12,5 % der Isolate trugen zusätzlich zu *stx* das *EhlyA*-Gen, 6,25 % das *eae*-Gen und 12,5 % sowohl das *eae*- als auch das *EhlyA*-Gen. Für weitere Angaben siehe Tabelle 4.3.

4.1.3 Wasserproben

In den Jahren 2009 und 2010 wurde jeweils eine Wasserprobe untersucht. In beiden Fällen waren keine *stx*-Gene nachweisbar. 2011 wurden 27 Wasserproben (19 Badegewässer- und acht Trinkwasserproben) untersucht. Davon waren zwei Trinkwasserproben und drei Badegewässerproben *stx*-positiv. Die Mischkulturen beider *stx*-positiven Trinkwasserproben waren *stx*1- und *stx*2-positiv. Bei einer dieser Proben wies auch das Isolat beide Gene auf (*stx*1/*stx*2, O125:H28), bei der zweiten Probe jedoch ließen sich zwei Keime mit jeweils nur einem der beiden *stx*-Gene nachweisen (*stx*1, O125:H28; *stx*2, O136:Hnt). Zwei der drei *stx*-positiven Badegewässerproben waren in der Mischkultur *stx*1-positiv, die dritte Probe war *stx*2-positiv. In zwei Fällen verlief die Keimsuche ergebnislos, in einem Fall wurde keine Keimsuche durchgeführt.

ERGEBNISSE

Tab. 4.2: Lebensmittelproben 2009 bis 2011

	2009	2010	2011	2009-11	% der Proben gesamt	% der stx-pos. Proben	% der Isolate
Untersuchungen gesamt	360	331	830	1521	100		

Virulenzgene (MK)

stx-negativ	332	321	809	1462	96,1		
stx-positiv	28	10	21	59	3,9	100	
stx2	11	7	17	35		59,3	
stx1, stx2	11	3	2	16		27,1	
stx1	6	-	2	8		13,6	

Virulenzgene (Isolat)

KS negativ	9	6	13	28		47,5	
Isolate	19	4	8	31	2,0	52,5	100
stx2	10	2	4	16			51,6
stx2, EhlyA	1	2	3	6			19,3
stx1	3	-	-	3			9,7
stx1, stx2, EhlyA	3	-	-	3			9,7
stx1, EhlyA	2	-	1	3			9,7

KS: Keimsuche

Tab. 4.3: Schlachtkörperproben 2009 bis 2011

	2009	2010	2011	2009-11	% der Proben gesamt	% der stx-pos. Proben	% der Isolate
Untersuchungen gesamt	37	0	32	69	100		

Virulenzgene (MK)

stx-negativ	12		29	41	59,4		
stx-positiv	25		3	28	40,6	100	
stx1	9		1	10		35,7	
stx2	8		2	10		35,7	
stx1, stx2	8		-	8		28,6	

Virulenzgene (Isolat)

keine KS	7		-	7		25,0	
KS negativ	3		2	5		17,9	
Isolate	15		1	16	23,2	57,1	100
stx1	7		-	7			43,75
stx2	2		1	3			18,75
stx2, EhlyA	2		-	2			12,5
stx1, stx2, eae, EhlyA	2		-	2			12,5
stx1, stx2	1		-	1			6,25
stx1, stx2, eae	1		-	1			6,25

4.1.4 Tierkotproben

Sieben Rinderkotproben wurden 2009 zur STEC-Untersuchung eingesandt, sechs der Proben waren *stx*-positiv und vier Keime konnten isoliert werden. 2010 wurden 80 Tierkotproben untersucht (47 Rinderkot-, sieben Mastkälberkot-, zwölf Pferdekot-, sechs Ziegenkot-, drei Schafkot-, zwei Hundekotproben und jeweils eine Damwild-, Kaninchen- und Katzenkotprobe). 44 der Proben (55 %) waren *stx*-positiv (darunter 27 Proben vom Rind, sieben von Mastkälbern, fünf von Ziegen, drei von Schafen, eine vom Damwild und eine vom Pferd). Acht Keime wurden isoliert (18,2 %). Im Jahr 2011 wurden 153 Tierkotproben untersucht (147 Rinderkot-, vier Hundekot- sowie zwei Kaninchenkotproben), hiervon waren 111 Rinderkotproben (72,6 %) *stx*-positiv und es konnten 40 Isolate (37,4 %) gewonnen werden.

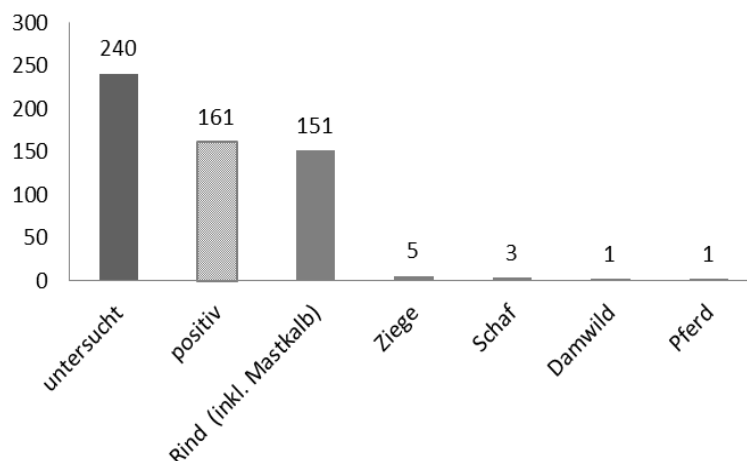


Abb. 4.8:

Darstellung der untersuchten Tierkotproben 2009 bis 2011 (n = 240), des *stx*-positiven Probenanteils (n = 161; 67,1 %) und seiner tierartlichen Verteilung.

In der Gesamtschau aller drei Jahre waren 67,1 % (161) der untersuchten Tierkotproben *stx*-positiv. Am häufigsten wurde die Kombination beider *stx*-Gene (*stx1*, *stx2*) in Tierkot-Mischkulturen nachgewiesen (47,2 %, 76 Proben), während *stx2* das häufigste Virulenzgen in Isolaten aus Tierkotproben war (42,3 %, 22 Isolate). Wie bereits ähnlich bei Lebensmittel- und Schlachtkörperproben festgestellt, trägt auch der Großteil (76,9 %) der *stx*-positiven Tierkotiisolate ausschließlich *stx*-Gene als Virulenzgene. *eae* ließ sich in 1,9 %, *EhlyA* in 5,8 % und die Kombination beider Gene in 15,4 % der Probenisolate nachweisen. Ausführliche Daten hierzu in Tabelle 4.4.

ERGEBNISSE

Tab. 4.4: Tierkotproben 2009 bis 2011

	2009	2010	2011	2009-11	% der Proben gesamt	% der stx-pos. Proben	% der Isolate
Untersuchungen gesamt	7	80	153	240	100		
Virulenzgene (MK)							
stx-negativ	1	36	42	79	32,9		
stx-positiv	6	44	111	161	67,1	100	
stx1, stx2	2	27	47	76		47,2	
stx2	4	11	53	68		42,2	
stx1		6	11	17		10,6	
Virulenzgene (Isolat)							
keine KS		34	4	38		23,6	
KS negativ	2	2	67	71		44,1	
Isolate	4	8	40	52	21,7	32,3	100
stx2		1	21	22			42,3
stx1, stx2		5	8	13			25,0
stx1		1	4	5			9,6
stx2, eae, EhlyA	2		3	5			9,6
stx1, stx2, eae, EhlyA	1		1	2			3,9
stx1, eae		1		1			1,92
stx2, EhlyA	1			1			1,92
stx1, stx2, EhlyA			1	1			1,92
stx1, eae, EhlyA			1	1			1,92
stx1, EhlyA			1	1			1,92

KS: Keimsuche

4.2 Verteilung der Serovaren untersuchter EHEC/STEC-Stämme

Die Serotypisierungsergebnisse des RKI, Wernigerode, und des BfR, Berlin, wurden über einen Zeitraum von September 2004 bis einschließlich Dezember 2011 erfasst und ausgewertet. Dabei wurden die Serotypisierungsergebnisse der Jahre 2004 bis 2008 aufgrund der geringen Anzahl serotypisierter Lebensmittel-, Schlachtkörper-, Wasser- und Tierkotprobenisolate aus den Jahren 2009 bis 2011 mit einbezogen. Keine Berücksichtigung fanden nicht typisierbare (Ont) oder als „rough“ (Orf) typisierte Isolate. Eine vollständige Übersicht aller nachgewiesenen O:H-Antigenkombinationen aus EHEC-, Lebensmittel-, Schlachtkörper-, Wasser- sowie Tierkotprobenisolaten findet sich in Anhang 8.2, Tabellen 8.4 bis 8.8.

4.2.1 Humane Proben

Bei 772 (81,6 %) von 946 an das RKI eingesandten humanen Isolaten wurde eine eindeutige O-Serogruppe bestimmt. Die restlichen Isolate waren Ont oder Orf. Dabei zeigte sich, dass O26, O103, O111, O145 und O157 in Bayern zu den zehn meist nachgewiesenen Serovaren bei EHEC-Erkrankungen gehören (siehe auch Abb. 4.9). Zusammen machen diese fünf Serogruppen 43,9 % aller typisierten Isolate bzw. 46,8 % der nicht O104:H4-Isolate aus (insgesamt 339 EHEC-Stämme).

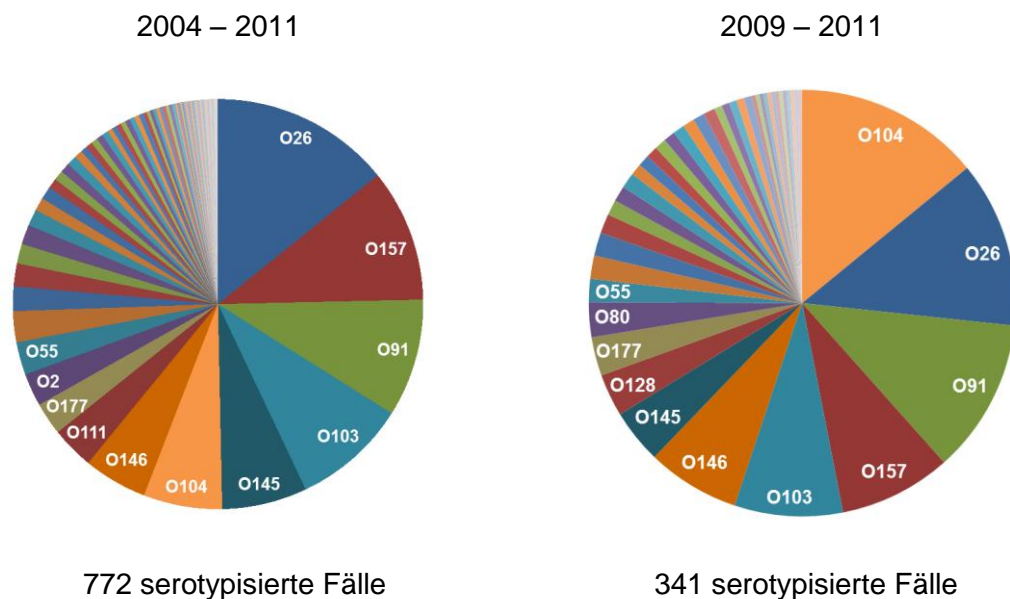


Abb. 4.9: Vergleichende Darstellung der Serogruppenverteilung bei EHEC-Fällen in den Jahren 2004 bis 2011 sowie 2009 bis 2011. Alle O104-Fälle wurden im Jahr 2011 nachgewiesen (n = 48; 47 O104:H4-Fälle sowie ein O104:H7-Fall).

Die Auswertung ergab, dass 45,1 % (153 Isolate) der O26-, O103-, O111-, O145- und O157-Stämme *stx1*-positiv, 39 % (132) *stx2*-positiv und 15,9 % (54) *stx1*- und *stx2*-positiv waren. 312 Isolate, d. h. 92 %, trugen zusätzlich sowohl das *eae*- als auch das *EhlyA*-Gen, weitere 6,5 % (22) entweder *eae* oder *EhlyA* und nur 1,5 % (5 Isolate) besaßen keines der beiden Gene. Letzteres bedeutet einen deutlichen Unterschied zu den restlichen 386 serotypisierten Isolaten, welche nicht zu einem der fünf oben genannten Serovaren oder zu den 47 O104:H4-Isolaten gehören. Denn 23,3 % (90) dieser Isolate trugen sowohl *eae* als auch *EhlyA*, 43,5 % (168) entweder *eae* oder *EhlyA* und bei ganzen 33,2 % (128) konnte weder das *eae*-Gen noch das *EhlyA*-Gen nachgewiesen werden. Vergleichbar war

hingegen die Auswertung der *stx*-Gene: 42,7 % (165) waren *stx1*-positiv, 37,6 % (145) *stx2*-positiv und 19,7 % (76) *stx1*- und *stx2*-positiv.

Die zehn in Tabelle 4.5 aufgeführten, am häufigsten nachgewiesenen O:H-Antigenkombinationen machten 57,5 % aller serotypisierbaren EHEC-Stämme aus. Dabei ist auch hier zu beachten, dass die EHEC-Serovar O104:H4 ausschließlich im Jahr 2011 nachgewiesen wurde.

Tab. 4.5: Die 10 häufigsten EHEC-Serovaren aus humanen Isolaten 09/2004 bis 12/2011 des LGL, Oberschleißheim

Serovar	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Anzahl gesamt
O26:H11	5	11	15	17	10	8	10	20	96
O103:H2	1	14	6	7	12	6	7	15	68
O157:H-	2	13	11	3	6	2	2	10	49
O145:H-	1	6	7	3	-	2	7	22	48
O91:H-	2	7	2	12	8	6	5	5	47
O104:H4	-	-	-	-	-	-	-	47	47
O157:H7	2	3	4	5	5	1	6	2	28
O111:H-	1	7	3	6	3	1	1	3	25
O91:H14	-	3	5	3	2	2	-	5	20
O146:H21	-	3	-	1	1	2	2	7	16
Anzahl gesamt	14	67	53	57	47	30	40	136	444

4.2.1.1 HUSEC-Stammabgleich (2009 bis 2011)

In der Stammsammlung des *Konsiliarlabors für Hämolytisch-Urämisches Syndrom (HUS)* am Institut für Hygiene der Universität Münster finden sich die von MELLMANN et al. (2008a) beschriebenen HUS-assoziierten enterohämorrhagischen *E. coli* (HUSEC). Ein Vergleich anhand der Serovaren und Virulenzgene (*stx1*, *stx2*, *eae* und *EhlyA*) ergab allein für den Zeitraum 2009 bis 2011, dass 125 EHEC-Isolate als potenzielle HUSEC-Stämme in Frage kommen (siehe Anhang 8.2, Tab. 8.9). Fünf Rinderprobenisolate - ein Lebensmittelisolat (HUSEC040), zwei Schlachtkörperisolate (HUSEC040, HUSEC025) und drei Kotisolate (HUSEC013, HUSEC040, HUSEC003) - kommen ebenfalls als HUSEC-Stämme in Betracht. Für eine sichere Zuordnung ist jedoch eine weitere Subdifferenzierung dieser Bakterienstämme erforderlich.

4.2.2 Lebensmittel- und Schlachtkörperproben

Die im Zeitraum von 2004 bis 2011 durchgeführten Serotypisierungen umfassen 113 Lebensmittelproben tierischen Ursprungs und drei nicht tierischen Ursprungs. 66 dieser Proben (56,9 %) konnten erfolgreich serotypisiert werden, darunter eine einzige Probe nicht tierischen Ursprungs (Lindenblütentee, O22:H8, *stx2*). In den Proben tierischer Herkunft wurden die Serogruppen O2 (15,2 % aller typisierbaren Stämme), O21, O23 und O55 (jeweils 6,1 %) am häufigsten nachgewiesen. 19 der Bakterienstämme aus Lebensmitteln tierischen Ursprungs (18,2 % der typisierbaren Stämme) weisen Serogruppen auf, die am häufigsten bei humanen EHEC-Erkrankungen nachgewiesen wurden: zehnmal O2, jeweils dreimal O91 und O146 sowie jeweils einmal O26, O103 und O157. Sechs dieser Stämme (9,1 %) gehören auch anhand ihrer O:H-Antigenformel zu den zehn häufigsten beim infizierten Menschen nachgewiesenen EHEC-Serovaren in Bayern (O26:H11, O103:H2, O157:H-, O146:H21 und zweimal O91:H-).

Die 16 gewonnenen Schlachtkörperisolate stammen aus den Jahren 2009 und 2011; aus den Jahren 2004 bis 2008 liegen keine Serotypisierungsergebnisse vor. Insgesamt wurden 13 vollständige Serotypisierungsergebnisse ermittelt. Die häufigste nachgewiesene Serogruppe war O8 (fünf Isolate), gefolgt von O55 (zwei Isolate). Eines dieser Schlachtkörperisolate gehört mit der Serogruppe O2 zur zehnt häufigsten humanen EHEC-Serogruppen.

4.2.3 Wasserproben

2004 bis 2011 wurden 46 *stx*-positive Wasserprobenisolate zur Serotypisierung eingesandt, bei 28 davon (60,9 %) ließ sich das O-Antigen bestimmen. O175 (vier Isolate; 14,3 %), O113, O154 und O55 (jeweils drei Isolate; 10,7 %) wurden am häufigsten nachgewiesen. Eines der Trinkwasserisolate von 2004 gehört mit der Serovar O103:H2 zu den zehn häufigsten STEC-Stämmen, die im Zeitraum von 2004 bis 2011 bei EHEC-infizierten Menschen in Bayern gefunden wurden.

4.2.4 Tierkotproben

Es wurden von September 2004 bis einschließlich 2011 136 *stx*-positive Isolate aus Tierkot zur Serotypisierung eingesandt. Bei 100 dieser Isolate wurden insgesamt 41 verschiedene O-Antigene gefunden. Die häufigsten Serogruppen waren O91 (10 %), O145 und O55 (jeweils 6 %).

Unter den nachgewiesenen Serogruppen gehörten 28 (28 % der typisierten Tierkotisolate) zu den häufigsten im Zusammenhang mit EHEC-Fällen beim Menschen aufgetretenen (zehnmal O91, sechsmal O145, jeweils zweimal O26, O103, O157, O177 und O2 und jeweils einmal O111 und O146). Zwölf dieser Isolate (12 %) sind auch anhand der kompletten O:H-Antigenformel zu den zehn häufigsten EHEC-Erregern in Bayern zu zählen (O157:H-, O157:H7, O111:H-, O146:H21, zweimal O26:H11 sowie sechsmal O145:H-).

4.3 Etablierung der qualitativen Real-Time PCR-Systeme (EcS-PCR)

4.3.1 Selektivität

4.3.1.1 Inklusivität

Alle 50 *E. coli*-Stämme der Serogruppen O26, O103, O145 und O157 und alle 25 *E. coli*-Stämme der Serogruppe O111 wurden sowohl durch das Singleplex als auch durch das Pentaplex PCR-System zuverlässig erkannt (siehe Anhang 8.2, Tabellen 8.10a bis 10e).

Insgesamt wurden acht *E. coli*-Stämme mit zuvor serologisch bestimmter Serovar in der Real-Time PCR falsch-negativ gemessen (Singleplex und Pentaplex-System). Eine erneute serologische Subtypisierung dieser Isolate ergab jedoch in jedem Fall eine andere Serogruppe als zunächst angenommen. Bei drei der in dieser Studie untersuchten Stämme wich das EcS-PCR-Ergebnis falsch-positiv von dem der ursprünglichen Serotypisierung ab. In allen drei Fällen stimmte die zweite serologische Serotypisierung mit dem Ergebnis der PCR überein (siehe auch Tab. 4.6). Die Inklusivität liegt damit bei 100 %.

ERGEBNISSE

Tab. 4.6: Falsch-negative und falsch-positive Serogruppennachweise

Jahr	LGL-Nummer	Ergebnisse			Probenmaterial	Pathovar
		Serovar	EcS-PCR	2. Serotypisierung		
2007	76137-002	O111:H-	negativ	O113:H4	Stuhl	EHEC
2007	LM 15255	O103:H28	negativ	O146:H28	LM ¹	STEC
2007	LM 15261	O103:H31	negativ	O110:H31	LM ²	STEC
2008	46796-005	O157:H-	negativ	O156:H-	Stuhl	EHEC
2008	40560-003 vet.	O157:H-	negativ	Ont:H-	Kot ³	STEC
2009	K 23	O157:H-	negativ	Ont:H-	LM ⁴	STEC
2009	Vet. 75143-001	O157:H-	negativ	Ont:H-	Darm ⁵	STEC
2009	Vet. 80046-007	O157:H-	negativ	O8:H19	Darm ⁵	STEC
k. A.	9	O158:H16	wzx _{O26}	O26:H-	Kot ³	EPEC
2007	72592	O103:H21	ihp1 _{O145}	O145:H21	Stuhl	EHEC
2007	41274-015	O15:H16	ihp1 _{O145}	O145:H-	Kot ³	STEC

k. A.= keine Angabe; ¹ Reh (Edelgulasch), ² Rehschnitzelfleisch, ³ Rind ⁴ Milch, ⁵ Mastkalb

4.3.1.2 Exklusivität

4.3.1.2.1 *Enterobacteriaceae*-Stämme

Von den 44 untersuchten DNA-Isolaten aus *Enterobacteriaceae*-Stämmen waren 42 im Singleplex und Pentaplex PCR-System wie erwartet negativ. Die DNA zweier Stämme wies ein positives Ergebnis in beiden PCR-Systemen auf: *Serratia entomophila* (*rfbE*_{O157}-positiv) und *Shigella* sp. LGL 2869 (*wbd1*_{O111}-positiv). Die Ergebnisse wurden durch wiederholte PCR-Ansätze bestätigt. Damit liegt die Exklusivität bezüglich *Enterobacteriaceae*-Stämmen bei 95,5 %. Für eine Auflistung aller 44 Stämme siehe Tabelle 4.7.

4.3.1.2.2 *E. coli*-Stämme anderer Serogruppen

Die Messungen von DNA-Isolaten aus *E. coli*-Stämmen mit insgesamt 95 verschiedenen Serogruppen (ausschließlich O26, O103, O111, O145 und O157) fielen im Singleplex und im Pentaplex PCR-System negativ aus. Die Exklusivität bezüglich *E. coli* dieser anderen Serogruppen beträgt somit 100 %. Eine Auflistung aller eingesetzten Bakterienstämme ist in Anhang 8.2, Tabelle 8.11 zu finden.

ERGEBNISSE

Tab. 4.7: *Enterobacteriaceae*-Stämme in der EcS-PCR

Genus / Spezies			Stamm			Virulenzgene			EcS-PCR
						stx 1	stx 2	eae	Gen
1	<i>Citrobacter farmeri</i>	DSM 17655	-	-	-	-	-	-	-
2	<i>Edwardsiella tarda</i>	DSM 30052	-	-	-	-	-	-	-
3	<i>Enterobacter amnigenus</i>	DSM 4486	-	-	-	-	-	-	-
4	<i>Enterobacter asburiae</i>	DSM 17506	-	-	-	-	-	-	-
5	<i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 3264	-	-	-	-	-	-	-
6	<i>Enterobacter cowanni</i>	DSM 18146	-	-	-	-	-	-	-
7	<i>Enterobacter gergovia</i>	LGL 664	k. A.	k. A.	k. A.	-	-	-	-
8	<i>Enterobacter helveticus</i>	DSM 18396	-	-	-	-	-	-	-
9	<i>Enterobacter kobei</i>	DSM 13645	-	-	-	-	-	-	-
10	<i>Enterobacter ludwigii</i>	DSM 16688	-	-	-	-	-	-	-
11	<i>Enterobacter pulveris</i>	DSM 19144	-	-	-	-	-	-	-
12	<i>Enterobacter pyrinus</i>	DSM 12410	-	-	-	-	-	-	-
13	<i>Enterobacter radicinnitans</i>	DSM 16656	-	-	-	-	-	-	-
14	<i>Enterobacter turiscensis</i>	DSM 18397	-	-	-	-	-	-	-
15	<i>Erwinia aphidicola</i>	DSM 19347	-	-	-	-	-	-	-
16	<i>Escherichia hermannii</i>	DSM 4560	-	-	-	-	-	-	-
17	<i>Ewingella americana</i>	DSM 4580	-	-	-	-	-	-	-
18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSM 30104	-	-	-	-	-	-	-
19	<i>Kluyvera ascorbata</i>	DSM 4611	-	-	-	-	-	-	-
20	<i>Morganella morganii</i>	DSM 14850	-	-	-	-	-	-	-
21	<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 4479	-	-	-	-	-	-	-
22	<i>Providencia rettgeri</i>	DSM 4542	-	-	-	-	-	-	-
23	<i>Rahnella aquatilis</i>	DSM 4594	-	-	-	-	-	-	-
24	<i>Salmonella bongori</i>	DSM 13772	k. A.	k. A.	k. A.	-	-	-	-
25	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>arizonae</i>	DSM 9386	-	-	-	-	-	-	-
26	<i>Serratia entomophila</i>	DSM 12358	-	-	-	-	-	-	<i>rfbE</i> ₀₁₅₇
27	<i>Serratia grimesii</i>	DSM 30063	-	-	-	-	-	-	-
28	<i>Shigella</i> sp.	LGL 16570	k. A.	k. A.	k. A.	-	-	-	-
29	<i>Shigella</i> sp.	LGL 16575	k. A.	k. A.	k. A.	-	-	-	-
30	<i>Shigella</i> sp.	LGL 1850	k. A.	k. A.	k. A.	-	-	-	-
31	<i>Shigella</i> sp.	LGL 1862	k. A.	k. A.	k. A.	-	-	-	-
32	<i>Shigella</i> sp.	LGL 2468	k. A.	k. A.	k. A.	-	-	-	-
33	<i>Shigella</i> sp.	LGL 2869	k. A.	k. A.	k. A.	-	-	-	<i>wbd1</i> ₀₁₁₁
34	<i>Shigella</i> sp.	LGL 7594	k. A.	k. A.	k. A.	-	-	-	-
35	<i>Shigella boydii</i>	LGL 457266	k. A.	k. A.	k. A.	-	-	-	-
36	<i>Shigella flexneri</i>	DSM 4782	-	-	-	-	-	-	-
37	<i>Shigella flexneri</i>	LGL 451743	k. A.	k. A.	k. A.	-	-	-	-
38	<i>Shigella sonnei</i>	DSM 5570	-	-	-	-	-	-	-
39	<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 25931	k. A.	k. A.	k. A.	-	-	-	-
40	<i>Shigella</i> sp.	LGL ST 14096	k. A.	k. A.	k. A.	-	-	-	-
41	<i>Trabulsiella guamensis</i>	DSM 16940	-	-	-	-	-	-	-
42	<i>Xenorhabdus nematophila</i>	DSM 3370	-	-	-	-	-	-	-
43	<i>Yersinia aleksiciae</i>	DSM 14987	-	-	-	-	-	-	-
44	<i>Yokenella regensburgei</i>	DSM 5079	-	-	-	-	-	-	-

4.3.2 Sensitivität

Die Standardkurvenmittelwerte einschließlich der Standardabweichung von jeweils drei Messungen aus drei separat erstellten Verdünnungsreihen ($n = 9$) sind in Tabelle 4.8 dargestellt. Die Effizienzwerte liegen allesamt im Referenzbereich von $100 \% \pm 10 \%$, ebenso die R^2 -Werte mit Ergebnissen von $\geq 0,98$.

Tab. 4.8: PCR-Effizienzen und R^2 -Werte (Mittelwert \pm Standardabweichung; $n = 9$)

EcS-PCR	Farbstoff	PCR-System			
		Singleplex [†]		Pentaplex [‡]	
		Effizienz (%)	R^2	Effizienz (%)	R^2
O26	FAM [†] / ATTO 425 [‡]	$97 \pm 0,4$	$0,987 \pm 0,010$	100 ± 1	$0,989 \pm 0,005$
O103	HEX	$101 \pm 1,1$	$0,978 \pm 0,030$	103 ± 1	$0,994 \pm 0,002$
O111	CY 5	$98 \pm 2,7$	$0,990 \pm 0,003$	98 ± 3	$0,998 \pm 0,002$
O145	Texas Red	$102 \pm 3,3$	$0,996 \pm 0,002$	99 ± 3	$0,992 \pm 0,005$
O157	FAM	$102 \pm 4,4$	$0,981 \pm 0,014$	$98 \pm 1,2$	$0,996 \pm 0,001$

Die hiermit ermittelte Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) gibt die letzte Verdünnungsstufe wieder, in der alle neun von neun Messpunkten positiv detektiert wurden (in Anlehnung an die Norm ISO 22118:2011). Das Multiplex PCR-System erwies sich dabei im Vergleich zum Singleplex PCR-System als gleich sensitiv. So lag die LOD der Singleplex Real-Time PCR-Systeme zum Nachweis von *E. coli* O26, O103, O111 und O157 bei 400 Genomkopien/2 μ l DNA-Lösung, zum Nachweis von *E. coli* O145 bei 40 Genomkopien/2 μ l DNA-Lösung. Die LOD des Pentaplex Real-Time PCR-Systems lag beim Nachweis von *E. coli* O26 bei 400 Genomkopien und beim Nachweis von *E. coli* O103, O111, O145 und O157 bei 40 Genomkopien/2 μ l DNA-Lösung.

Tab. 4.9: Nachweisgrenzen (LOD) in Genomkopien/2 μ l DNA-Lösung

EcS-PCR	Farbstoff	PCR-System	
		Singleplex [†]	Pentaplex [‡]
O26	FAM [†] / ATTO 425 [‡]	400	400
O103	HEX	400	40
O111	CY 5	400	40
O145	Texas Red	40	40
O157	FAM	400	40

ERGEBNISSE

Die folgenden Abbildungen 4.10a und 4.10b zeigen beispielhaft für das Singleplex PCR-System zum Nachweis der *E. coli*-Serogruppe O145 bzw. für die O145-Komponente des Pentaplex PCR-Systems eine der drei gemessenen Standardkurven.

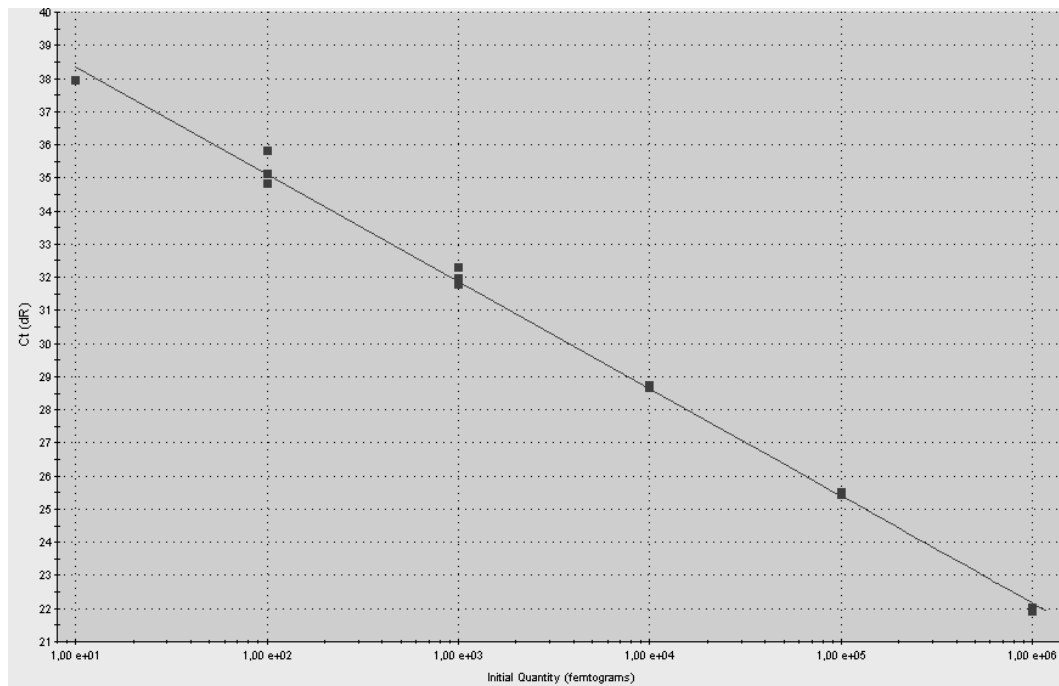


Abb. 4.10a: Singleplex PCR-System: O145 (Effizienz = 103,7 %, $R^2 = 0,997$)

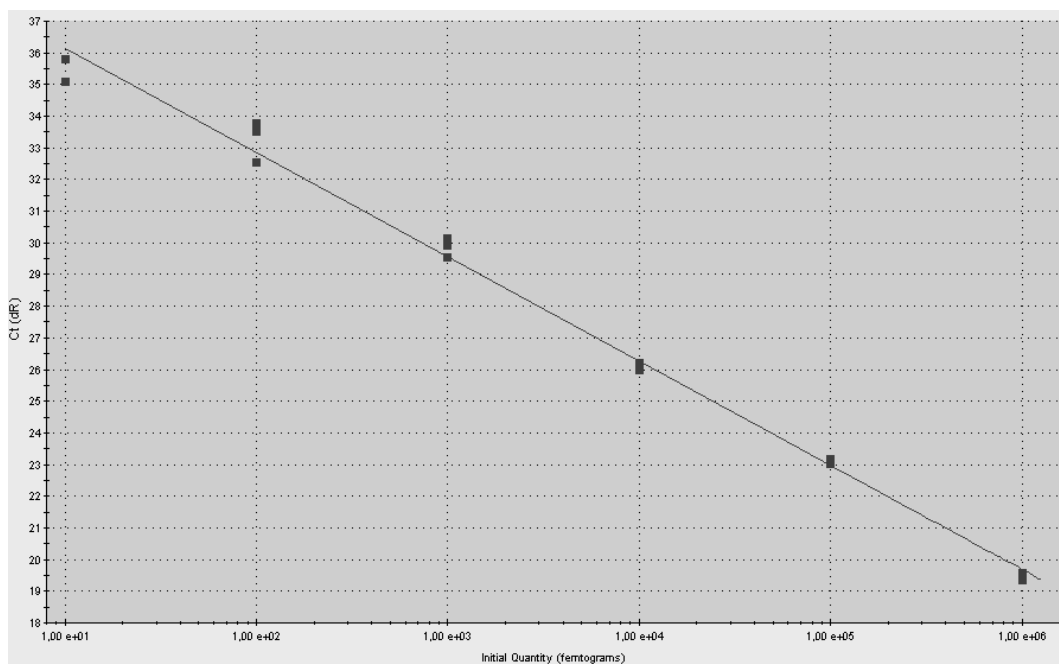


Abb. 4.10b: Pentaplex PCR-System: O145 (Effizienz = 101,2 %, $R^2 = 0,993$)

4.3.3 Präzision und Richtigkeit

Die Variationskoeffizienten betrugen für die Singleplex PCR-Systeme zwischen 0,2 und 3,3 % und für die Pentaplex PCR-Systeme zwischen 0,4 und 2,5 %. Ausführliche Ergebnisse sind in Tabelle 4.10 zu finden. Für den Nachweis der Serogruppen O26, O103, O145 und O157 wurden je 50, für die Serogruppe O111 25 *E. coli*-Stämme gemessen. Alle Messergebnisse waren dem des Referenzstammes entsprechend positiv (siehe Tabellen 8.10.a bis 8.10.e).

4.3.4 Serogruppen-Nachweis in *stx*-negativen Stuhlproben-Mischkulturen

Um das Vorkommen der virulenzassoziierten *E. coli*-Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157 in *stx*-negativem, humanem Stuhl zu untersuchen, wurden 100 EHEC-negative Stuhlproben aus der Routinediagnostik des LGL, Oberschleißheim, analysiert. Fünf der Mischkulturproben zeigten ein positives Real-Time PCR-Ergebnis in der Pentaplex EcS-PCR (siehe Tabelle 4.11 sowie die Auflistung aller untersuchten Mischkulturen in Anhang 8.2, Tabelle 8.12). Die Keimsuche anhand von mindestens 50 Einzelkolonien je positiver Probe war nicht erfolgreich, so dass kein Isolat zum Nachweis der Spezies *E. coli* gewonnen werden konnte.

ERGEBNISSE

Tab. 4.10: Ergebnisse der Präzisionsbestimmung der Singleplex und Pentaplex EcS-PCR-Systeme

STEC-Ref.-DNA	V	Singleplex			Pentaplex		
		C _t -Mittelwert	Standardabweichung	Variationskoeffizient in %	C _t -Mittelwert	Standardabweichung	Variationskoeffizient in %
O26	V1	24,54	0,18	0,7	23,41	0,21	0,9
	V2	27,42	0,14	0,5	26,61	0,15	0,6
	V3	30,61	0,24	0,8	30,32	0,23	0,8
	V4	34,27	0,37	1,1	33,63	0,20	0,6
	V5	38,19	1,26	3,3	36,77	0,51	1,4
	V6	No Ct			No Ct		
	V7	No Ct			No Ct		
O103	V1	25,69	0,31	1,2	21,85	0,21	1,0
	V2	29,19	0,05	0,2	25,20	0,19	0,8
	V3	32,72	0,19	0,6	28,47	0,20	0,7
	V4	36,24	0,23	0,6	31,94	0,20	0,6
	V5	No Ct			35,26	0,65	1,9
	V6	No Ct			No Ct		
	V7	No Ct			No Ct		
O111	V1	27,17	0,33	1,2	20,63	0,31	1,5
	V2	30,18	0,49	1,6	23,80	0,21	0,9
	V3	33,96	0,41	1,2	27,18	0,19	0,7
	V4	37,31	0,75	2,0	30,55	0,17	0,6
	V5	No Ct			34,02	0,41	1,2
	V6	No Ct			No Ct		
	V7	No Ct			No Ct		
O145	V1	22,86	0,08	0,3	19,44	0,22	1,1
	V2	25,67	0,25	1,0	22,98	0,10	0,4
	V3	29,28	0,05	0,2	26,12	0,12	0,5
	V4	32,69	0,15	0,5	29,82	0,16	0,5
	V5	35,72	1,05	3,0	33,41	0,83	2,5
	V6	No Ct			No Ct		
	V7	No Ct			No Ct		
O157	V1	21,92	0,10	0,5	21,01	0,27	1,3
	V2	25,37	0,11	0,4	24,42	0,14	0,6
	V3	28,84	0,09	0,3	27,95	0,18	0,7
	V4	32,09	0,15	0,5	31,21	0,18	0,6
	V5	35,72	0,27	0,7	34,80	0,57	1,6
	V6	No Ct			No Ct		
	V7	No Ct			No Ct		

STEC-Ref.-DNA = DNA der STEC-Referenzstämme; V = Verdünnungsstufe;
V1=1 ng; V2 = 100 pg; V3 = 10 pg; V4 = 1 pg; V5 = 100 fg; V6 = 10 fg; V7 = 1 fg

Tab. 4.11: Serogruppen-positive und *stx*-negative humane Stuhlproben (MK)

Lfd. Nr.	Jahr	LGL-Nummer	<i>stx</i> -Ergebnis	EcS-PCR-Ergebnis	C _t -Wert
3	2011	129544	negativ	<i>ihp1</i> _{O145}	34
31	2011	132673	negativ	<i>ihp1</i> _{O145}	20
95	2011	136298-001	negativ	<i>ihp1</i> _{O145}	24
98	2011	136219	negativ	<i>rfbE</i> _{O157}	30
99	2011	136218	negativ	<i>rfbE</i> _{O157}	36

V DISKUSSION

5.1 Vergleichende Auswertung der EHEC / STEC-Proben 2009 bis 2011 in Bayern und Serotypisierungsergebnisse

5.1.1 Humane EHEC-Proben

Zur Einsendung an das LGL, Oberschleißheim, gelangen über die Gesundheitsämter in der Regel Stuhlproben von Patienten mit bereits erfolgtem EHEC-Nachweis durch niedergelassene Labore oder mit Verdacht auf eine EHEC-Infektion sowie Proben aus Umgebungsuntersuchungen mit Bezug zu möglichen EHEC-Erkrankungen. In den Jahren 2009 bis 2011 waren rund 7 % der eingeschickten Proben *stx*-positiv. Damit blieb der Anteil *stx*-positiver Proben in allen drei Jahren annähernd unverändert, obwohl die untersuchte Probenzahl 2011 mehr als das Dreifache der Vorjahre betrug. Die überwiegende Anzahl humaner EHEC-Proben und Probenisolate trug das ***stx1***-Gen (44 %), gefolgt von ***stx2***-positiven Isolaten (36 %). Ein kleiner Anteil war für beide Gene positiv (20 %). Die prozentuale *stx*-Genverteilung gleicht dabei den vorangegangenen Untersuchungen humaner Stuhlproben aus Bayern im Zeitraum 2002 bis 2006 durch SCHREIBER (2008). In der Literatur sind vor allem bestimmte Stx2-Untergruppen (Stx2a, Stx2c, Stx2d, Stx2d_{act}) mit einer hohen Toxizität verknüpft, während die restlichen Shigatoxine eher milde Erkrankungsverläufe verursachen (FRIEDRICH et al. 2002; BIELASZEWSKA et al. 2006; DE SABLET et al. 2008).

Bei ca. 40 % aller humanen STEC-Isolate wurden sowohl ***eae*** als auch ***EhlyA*** nachgewiesen (insgesamt trugen 45,1% der Isolate das *eae*-Gen und 69,4 % das *EhlyA*-Gen). Lediglich ein Viertel hatte keines der beiden Gene. Die Funktion des *eae*-kodierte Intimins bei der Pathogenese von EHEC-Erkrankungen ist bekannt, als Adhäsine vermittelt es eine besonders innige Bindung zwischen Bakterium und Enterozyt und trägt dadurch zur Entstehung der A/E-Läsionen im Darmepithel bei (SCHMIDT 2010). Die Funktion des *EhlyA*-kodierte Enterohämolsins ist noch nicht vollständig geklärt (BROCKMEYER et al. 2011). ALDICK et al. (2007) zeigten, dass Enterohämolsin Kapillarendothelzellen schädigt und vermuten deshalb

eine Beteiligung in der Entstehung des HUS, zudem wurden Antikörper gegen Enterohämolysin im Blutserum von HUS-Patienten gefunden (SCHMIDT et al. 1995). Die Datenauswertung im Rahmen dieser Studie ergab in Bezug auf *eae* und *EhlyA* eine bemerkenswerte Aufspaltung: Von den EHEC-Stämmen, welche nicht zu den fünf Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157 gehören, tragen nur rund 23 % sowohl *eae* als auch *EhlyA*. Ein Drittel wies keines der beiden Gene auf. Dahingegen sind die fünf oben genannten Serogruppen zu 92 % sowohl *eae*- als auch *EhlyA*-positiv. Dieser Zusammenhang findet sich auch in der Literatur, denn die Gene *eae* und *EhlyA*, welche Intimin und Enterohämolysin kodieren, sind wie die Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157 häufig in Verbindung mit schweren EHEC- bzw. HUS-Erkrankungen beim Menschen zu finden (PATON und PATON 1998; OGURA et al. 2009; KÄPPELI et al. 2011). Dies ist ebenfalls in der von KARMALI et al. (2003a) eingeführten Einteilung von STEC in Seropathovaren dokumentiert. Stämme der oben genannten Serogruppen gehören den „hochvirulenten“ Seropathovaren A und B an und sind somit besonders häufig bei schweren Erkrankungsverläufen (HUS) und Ausbrüchen nachzuweisen. Diese Stämme tragen allesamt das *eae*-Gen und in der Regel auch das *EhlyA*-Gen. Eine direkte Ableitung des Erkrankungsverlaufs von der O-Gruppe oder von dem Vorhandensein von *EhlyA* ist jedoch nicht möglich. ETHELBERG et al. (2004) zeigten in einer Studie, dass die Präsenz von *stx2* und *eae* das Risiko einer HUS-Erkrankung erhöht, nicht die O-Gruppe eines STEC-Stammes. BOERLIN et al. (1999) wiesen ebenfalls die Verbindung von *stx2* und *eae* mit EHEC-Erkrankungen nach, während der Bezug von *EhlyA* zur Virulenz von STEC fraglich blieb.

Die EHEC-Serogruppen **O26, O103, O111, O145 und O157** gehören zu den häufigsten weltweit und so machen sie auch einen großen Anteil der EHEC-Isolate des LGL, Oberschleißheim, aus (2004 bis 2011: rund 47 % der nicht O104:H4-Isolate). Der Trend der letzten drei Jahre (2009 bis 2011) ist dementsprechend. BEUTIN (2011) zufolge sind O157:[H7], O26:[H11], O103:H2, O111:[H8] und O145:[H28] die wichtigsten EHEC-Serovaren und auch in Bayern sind diese Stämme unter den zehn am häufigsten nachgewiesenen EHEC-Serovaren zu finden. Vom

Konsiliarlabor für Hämolytisch-Urämisches Syndrom (HUS) am Institut für Hygiene der Universität Münster wurden bis dato 42 HUSEC-Stämme beschrieben (MELLMANN et al. 2008a). Diese Stammsammlung katalogisiert somit hochvirulente STEC-Stämme, welche aus HUS-Patienten isoliert wurden. Ein Stammabgleich mit humanen, bayerischen EHEC-Stämmen erbrachte 125 mögliche HUSEC-Stämme in den Jahren 2009 bis 2011 bei insgesamt 58 gemeldeten, bayerischen HUS-Fällen in diesem Zeitraum (RKI 2013). Es zeigt sich also, dass potenziell hochvirulente EHEC-Stämme bei Menschen in Bayern – wie auf der ganzen Welt - verbreitet sind (ECDC/EFSA 2011; USDA 2012a).

Doch auch seltener hochvirulente Serogruppen als die oben genannten gewinnen an Bedeutung. Die EHEC-Serogruppe O91 beispielsweise gehört zu den am häufigsten nachgewiesenen in Bayern und nimmt in den letzten drei Jahren sogar Platz 2 hinter O157 ein (ohne Berücksichtigung des Ausbruchsstammes EHEC O104:H4). Dabei gehören die bayerischen O91-Isolate jedoch überwiegend zur Serovar O91:H14 oder sind nicht beweglich. BIELASZEWSKA et al. (2009b) zufolge lösen diese Stämme meist nicht-blutige Diarrhoen aus und sind – im Gegensatz zu O91:H21 - nicht HUS-assoziiert. Des Weiteren werden in der Literatur auch die so genannten eEHEC (emerging EHEC) erwähnt. Es handelt sich dabei um EHEC-Stämme verschiedener Serovaren, die bislang nicht, nun aber im Zusammenhang mit humanen EHEC-Infektionen in Erscheinung treten. BUGAREL et al. (2010) benennen in ihrer Studie elf verschiedene eEHEC-Serovaren, die vereinzelt auch in humanem Stuhl (O103:H11, O118:H16, O55:H7), Tierkot (O177:H-, O5:H-) und Trinkwasser (O103:H25) aus Bayern nachgewiesen wurden. Die weitere Entwicklung und Ausbreitung dieser EHEC bleibt zu beobachten.

Mehr **Frauen** als Männer sind in Bayern von EHEC-Erkrankungen betroffen (56,6 % in den Jahren 2009 bis 2011; exkl. EHEC O104:H4). In der Literatur kommen andere Studien zu vergleichbaren Ergebnissen, wobei eine Ursache hierfür nicht beschrieben ist (HEDICAN et al. 2009: 57 %; LATHROP et al. 2009: 55 % O157 bzw. 52 % non-O157; RKI 2010: 56 %; 2011a: 61 %). Dabei steigt die Anzahl erkrankter Frauen erst mit

dem Erwachsenenalter an. Der Anteil männlicher Infizierter überwiegt je nach Quelle bis zu einem Alter von 15 Lebensjahren mehr oder weniger deutlich (RKI 2010, 2011a; ESHIMA et al. 2012) - in Bayern beträgt er 51 % (2009 bis 2011). Aufgrund dessen kann angenommen werden, dass neben organischen Faktoren auch die Lebensumstände und Verhaltensweisen der Betroffenen eine Infektion beeinflussen. So sind beispielsweise Eltern erkrankter Kleinkinder gefährdeter für Sekundärinfektionen (HUBER et al. 1998). Erwachsene, männliche Patienten suchen zudem seltener einen Arzt auf als weibliche, was ebenfalls als Ursache für geschlechtsspezifische Unterschiede bei EHEC-Erkrankungen nicht außer Acht gelassen werden kann (DINGES 2008).

Bei nicht-O104:H4 EHEC-Erkrankungen sind die **unter 1- bis 5-Jährigen** in Bayern die größte Altersgruppe. Diese Feststellung stimmt ebenfalls mit den Ergebnissen anderer Studien überein (CHART und CHEASTY 2008; EFSA 2009; LOOS et al. 2012). Als möglicher Grund wird eine altersabhängige Immunität gegenüber Shigatoxinen diskutiert, da junge Kinder und Ältere weniger Antikörper gegen Stx aufweisen als Menschen anderer Altersgruppen (KARMALI et al. 2003b; BOYER und NIAUDET 2011).

2011 kam es im Gegensatz zu den Vorjahren zu einer Verschiebung im Hinblick auf die Altersgruppen. Zwar war die Gruppe der infizierten Kinder im Alter von bis zu fünf Lebensjahren weiterhin dominierend (31,3 %), aber die Anzahl der unter 1- bis 20-Jährigen sank verhältnismäßig von rund 70 % in den beiden Vorjahren auf 52 %, während die der über 40-Jährigen von rund 11 % auf nun 26 % anstieg. Es ist plausibel, dass es sich hierbei um eine Folge der EHEC-Krise handelt. Denn aufgrund der öffentlichen Bekanntmachung folgten wahrscheinlich mehr Erwachsene der Aufforderung, bei Durchfallerkrankungen den Arzt zu konsultieren und es ist anzunehmen, dass auch die Labordiagnostik solcher Stuhlproben forciert wurde. Da viele dieser Infektionen andernfalls vermutlich nicht dokumentiert worden wären, könnten die Ergebnisse von 2011 ein realistischeres Bild der Altersverteilung bei EHEC-Erkrankungen in Bayern abgeben als in den Jahren zuvor. Diese Hypothese wird auch durch das Fehlen epidemiologischer Zusammenhänge bei nicht-O104:H4 EHEC-

Erkrankungen und den gleichzeitigen Anstieg von Fällen anderer *E. coli*-Pathovaren gestützt (ENGLUND und HAUTMANN 2012).

Ein zusätzliches Detail lässt sich aus den Zahlen der drei Jahre noch erkennen: Das *Robert Koch-Institut* berichtete vor der EHEC-Krise, dass bei deutschen EHEC-Erkrankten nach dem ersten Peak im Kleinkindalter kein „zweiter Häufigkeitsgipfel im höheren Lebensalter, wie er in der internationalen Literatur beschrieben wird“ vorkommt und führt das auf die seltenere Diagnostik bei Erwachsenen zurück (RKI 2011a). Unterteilt man hierauf die Gruppe der bayerischen über 40-Jährigen, so zeigt sich, dass der Prozentsatz der über 60-Jährigen EHEC-Betroffenen von rund 5 % bzw. 3 % in den Vorjahren im Jahr 2011 auf 14 % angestiegen ist (siehe hierzu auch Abbildung 4.5). In der bayerischen Statistik findet sich somit zwar der erwartungsgemäße Anstieg von nachgewiesenen EHEC-Erkrankungen in dieser Altersgruppe, aber auch bei forcierter Diagnostik kein zweiter Häufigkeitsgipfel.

Wie bereits ausführlich geschildert (Abschnitt 2.4.1.2.) stellt die Virulenz des **EHEC O104:H4**-Ausbruchsstammes einen bemerkenswerten Sonderfall dar. Begründet ist dies in der Kombination aus intensiver Adhärenz des Erregers an die Darmschleimhaut des Wirts, der Fähigkeit Shigatoxine zu produzieren und weiteren Faktoren wie beispielsweise diversen Antibiotikaresistenzen (BRZUSZKIEWICZ et al. 2011; MELLMANN et al. 2011). Bevor die Erkrankungswelle 2011 auch Bayern erfasste war die Serogruppe O104 in den letzten zehn Jahren nur zweimal im Jahr 2002 nachgewiesen worden (SCHREIBER 2008); einmal in einer humanen Probe (O104:H12; *stx1*, *stx2*) und einmal in einer Oberflächengewässerprobe (O104:H21; *stx1*, *stx2*, *EhlyA*). Bei diesen Stämmen unterscheiden sich jedoch sowohl das H-Antigen als auch das Virulenzgenprofil von dem des aktuellen Ausbruchsstammes. EHEC O104-Fälle werden in der Literatur sporadisch beschrieben, aber nur ein einziger Ausbruch von 1994 in Montana, USA, ist dokumentiert (CDC 1995; BAE et al. 2006; MELLMANN et al. 2008a). Dieser Ausbruchsstamm besaß die Antigene O104:H21, war *stx2*-positiv, *eae*-negativ sowie *EhlyA*-positiv und verursachte bei den Betroffenen Symptome bis hin zur Hämorrhagischen

Colitis (FENG et al. 2001). Bei den 47 bayerischen Erkrankten von 2011 entsprechen die Alters- und Geschlechtsverteilung sowie das genetische Profil denen des deutschlandweiten Ausbruchs: rund 79 % der Betroffenen waren erwachsen, ca. 70 % aller Infizierten waren weiblich. Die Zahlen des RKI (2012a) liefern vergleichbare Ergebnisse für ausbruchsassoziierte HUS- und EHEC-Erkrankungen. Die Dimension dieses Ausbruchs im relativ wenig betroffenen Bayern zeigt sich, wenn man die 47 Ausbruchsstammisolate in Relation zu allen anderen serotypisierten STEC des LGL, Oberschleißheim, setzt. Obwohl die EHEC-Serovar O104:H4 nur in einem zweimonatigen Zeitraum des Jahres 2011 nachgewiesen wurde (Erstfälle), liegt sie auf Platz 6 aller serotypisierten STEC seit 09/2004. Warum es derartig viele und vor allem schwere Erkrankungsverläufe bzw. Todesfälle gab, warum vorwiegend Erwachsene betroffen waren und warum Frauen den Großteil der EHEC O104:H4-Patienten ausmachten, ist bis dato noch nicht geklärt (FRIEDRICH 2011; ENGLUND und HAUTMANN 2012). Da Bockshornkleesamen bzw. deren Sprossen als primäre Infektionsquelle angesehen werden, kann es sich hierbei zumindest zunächst um eine selektive Infektion von weiblichen Erwachsenen aufgrund bestimmter Ernährungsgewohnheiten handeln (WICHMANN-SCHAUER et al. 2012). In einer bundesweiten Studie des *Max Rubner-Instituts* zu den Verzehrsgewohnheiten der Deutschen wird Frauen im Vergleich ein tendenziell höherer Verzehr von pflanzlichen Lebensmitteln, Männern ein höherer Verzehr von tierischen Lebensmitteln bescheinigt (MRI 2008).

5.1.2 Vorkommen von STEC in Lebensmitteln, Wasser, Schlachtkörpern und Tierkot 2009 bis 2011

STEC sind in bayerischen Lebensmitteln nicht oft nachzuweisen, obwohl EHEC-Erkrankungen meist als lebensmittelassoziiert gelten (BERGER et al. 2010; KASPAR et al. 2010; MARTIN und BEUTIN 2011). In den Jahren 2009 bis 2011 waren 3,9 % (59) der getesteten **Lebensmittel**-Mischkulturen *stx*-positiv. Der Hauptanteil stammte von Wiederkäuern (respektive Rindern) und war vorwiegend *stx2*-positiv. Nur in einem Fall handelte es sich um ein *stx*-positives Lebensmittel nicht-tierischen Ursprungs (Melissenblätter). Demnach sind STEC in Obst, Gemüse und

anderen nicht-tierischen Lebensmitteln in Südbayern äußerst selten. Diese Aussage stimmt mit einer Studie der EFSA (2011b) überein, bei der nur 0,2 % von knapp 6000 untersuchten Obst- und Gemüseproben aus europäischen Staaten *stx*-positiv waren. Die geringe Anzahl der untersuchten **Wasser**proben (29 in den Jahren 2009 bis 2011, davon fünf *stx*-positiv) lässt zum einen zwar keine repräsentativen Rückschlüsse bezüglich der isolierten Stämme zu, weist zum anderen aber auf die seltene Annahme einer STEC-Belastung im Wasser in Deutschland hin (UBA 2011).

Der Gastrointestinaltrakt von Wiederkäuern ist ein wichtiges Reservoir für STEC, folgerichtig wiesen Schlachtkörper- und vor allem Tierkotproben aus Bayern wie erwartet eine deutlich höhere STEC-Kontaminationsrate als Lebensmittelproben auf. Rund 41 % der **Schlachtkörper**proben (alle vom Rind) und 67 % der **Tierkot**proben (außer einer Probe vom Pferd alle vom Wiederkäuer) aus den Jahren 2009 bis 2011 waren *stx*-positiv. Die Mischkulturen von Schlachtkörperproben waren meist *stx1*- oder *stx2*-positiv, die von Tierkotproben waren hingegen meist *stx1*- und *stx2*-positiv. Letzteres ist auf die Vielfalt an STEC-Stämmen im Darm von Rindern zurückzuführen. Untersuchungen des *Bundesinstituts für Risikoüberwachung* (BfR) zufolge wird von einer „großen Heterogenität“ der STEC in Kälbern ausgegangen (BfR 2012a). Es gilt zu bedenken, dass die Beprobung von Wiederkäuern - insbesondere Rindern – im oben genannten Zeitraum überproportional zu andern Spezies erfolgte und deshalb keine Vergleiche bezüglich des STEC-Vorkommens bei verschiedenen Tierarten gezogen werden können. Zudem bezieht sich die Auswertung der Tierkotproben in dieser Studie auf einzelne Tiere bzw. Rinderherden und stellt kein flächenübergreifendes Ergebnis für ganz Bayern dar. Das BfR veröffentlicht regelmäßig Sammeldaten zur Situation der Zoonoseerreger in Deutschland und beziffert die Häufigkeit von STEC in Rinderherden für das Jahr 2010 mit rund 13 % (BfR 2012a). Schwankungen des STEC-Vorkommens sind sowohl zwischen verschiedenen Viehbeständen als auch saisonal innerhalb eines Viehbestands die Regel. Herden mit Dauerausscheidern haben gegebenenmaßen eine höhere Häufigkeit und die Ausscheidung von

STEC steigt im Spätsommer gegenüber dem restlichen Jahr deutlich an (MONAGHAN et al. 2011). Die erhöhte Ausscheidungsrate in Rinderbeständen korreliert dabei mit den gemeldeten humanen EHEC-Erkrankungen, welche ebenfalls im dritten Quartal eines Jahres ihr Maximum erreichen (RKI 2011a).

Die **Virulenzgenprofile** von STEC-Stämmen aus Lebensmitteln, Schlachtkörpern oder Tierkot unterscheiden sich meist von denen humaner STEC. Im Gegensatz zu den humanen Probenisolaten trugen über 61 % der *stx*-positiven Lebensmittelisolate, 69 % der Schlachtkörperisolate und 77 % der Tierkotalisolate dieser Studie weder das *eae*- noch das *EhlyA*-Gen. BUGAREL et al. (2010) beschreiben in ihrer Studie ebenfalls, dass *EhlyA* signifikant häufiger in EHEC als in STEC nachzuweisen ist und dass nur ein Bruchteil der STEC aus tierischen Lebensmitteln das *eae*-Gen trägt. Rund 17 % der Tierkotproben in dieser Arbeit waren *eae*-positiv, 21 % hatten das *EhlyA*-Gen. Davon unterscheiden sich die Auswertungen boviner Kotproben in der Literatur, wobei unterschiedliche Probennahme- und Analysemethoden keinen direkten Vergleich der gewonnenen Daten zulassen. In der Regel wurde *eae* nicht oder weitaus seltener als in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, wohingegen der Anteil *EhlyA*-positiver Isolate mit 30 % bis 77 % der STEC-Stämme deutlich höher war (VUKHAC und CORNICK 2008; FERNÁNDEZ et al. 2010; MONAGHAN et al. 2011; NGUYEN et al. 2011; OSMAN et al. 2012). Ein Grund hierfür könnte der oben beschriebene, eingeschränkte Probenumfang des LGL, Oberschleißheim, sein. Da die Kombination aus *eae*- und *EhlyA*-Gen mit schweren Erkrankungsverläufen beim Menschen assoziiert ist, könnte sich hieraus schließen lassen, dass die meisten STEC aus Rindern für den Menschen nicht hochvirulent sind, sondern bestimmte STEC-Stämme ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für den Menschen darstellen. PEARCE et al. (2006) zeigten in einer Studie zu *E. coli* O26, O103 und O145 bei Rindern, dass diese Stämme zum Großteil *eae*- sowie *EhlyA*-positiv und somit potenziell hochvirulent für den Menschen waren. Um diesbezüglich eine endgültige Aussage treffen zu können, sind jedoch weitere Untersuchungen nötig.

Die Auswertung der **Serotypisierungsergebnisse** seit September 2004 ergab, dass die humanassoziierten Serogruppen O2 und O55 in Lebensmitteln, O91, O145 und O55 in Tierkotproben sowie O8 und O55 in Schlachtkörperproben zu den häufigsten gehören, wobei auf die geringe Anzahl an Schlachtkörperisolaten (16) hingewiesen wird. Rinder machen in allen drei Probenkategorien den Hauptanteil aus und so ist es nicht überraschend, dass die oben genannten Serogruppen aus bayerischen Proben allesamt auch in Kälberproben (Fleisch und Darm) des deutschlandweiten Zoonosemonitorings gefunden wurden (BfR 2011b). Vereinzelte Stämme mit humanassoziierten Serovaren und Virulenzgenprofilen (*eae*, *EhlyA*) konnten im Rahmen dieser Studie isoliert werden: Von 2009 bis 2011 finden sich beispielsweise sechs STEC-Isolate aus Tierkot-, Schlachtkörper- und Lebensmittelproben, die anhand des Genprofils (*stx*, *eae*, *EhlyA*) HUSEC-Stämme sein können. WERBER et al. (2008) zeigten, dass zwar der Großteil der aus tierischen Lebensmitteln (vorwiegend Fleisch und Fleischerzeugnissen) isolierten STEC auch beim erkrankten Menschen gefunden wird, allerdings sind hochvirulente STEC-Stämme selten. In Fäzes- und Bodenproben von irischen Rinderfarmen fanden MONAGHAN et al. (2011) HUS-assoziierte STEC, wie z. B. *eae*-positive Seropathovar B-Stämme der Serovaren O26:H11 und O145:H28 nach KARMALI et al. (2003a). JORIS et al. (2011) wiesen die STEC-Serogruppen O26, O103, O111 und O145 in Kotproben von belgischen Schlachtrindern nach, wobei es von jeder Serogruppe auch *stx*-negative Isolate gab. Zwar führt eine fehlende Shigatoxinproduktion zu einer verminderten Virulenz für den Menschen, eine spätere, horizontale Aufnahme von *stx*-Genen über freie Bakteriophagen ist prinzipiell jedoch möglich (BETTELHEIM et al. 2005; IMAMOVIC et al. 2009). Zudem ist der Verlust von *stx*-Genen bei diesen Stämmen infolge der Subkultivierung denkbar (BfR 2011b).

Potenziell humanvirulente Stämme sind in Wiederkäuern also vorhanden. Die meisten STEC wurden in Tierkotproben, d. h. vor allem in Rinderkotproben nachgewiesen. Dazu passen auch die ebenfalls hohe STEC-Kontaminationsrate von Rinderschlachtkörpern sowie das Überwiegen von *stx*-positiven Lebensmitteln aus Wiederkäuern gegenüber anderen

Lebensmitteln, denn die Übertragung von STEC auf den Menschen wird hauptsächlich mit fäkalen Verunreinigungen durch Wiederkäuer begründet. Insbesondere beim Ausweiden der Schlachtkörper oder beim Melken besteht ein prozessbedingt hohes Risiko für Kontaminationen (MARTIN und BEUTIN 2011). In einer Studie von FRANK et al. (2008) steht die Rinderichte in Deutschland in direktem Zusammenhang mit der STEC-Infektionshäufigkeit in der Bevölkerung bzw. mit dem Vorkommen der STEC-Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157 bei Kindern. Je mehr Rinder es in der unmittelbaren Umgebung gibt, desto höher die Prävalenz. Andererseits gilt es zu bedenken, dass nicht alle potenziell humanvirulenten STEC-Stämme von Wiederkäuern auch tatsächlich humanvirulent sind. CLAWSON et al. (2009) zeigten, dass nur ein kleiner Anteil der bovinen STEC O157 bei humanen EHEC-Erkrankungen zu finden ist, während der Großteil sich auf den Primärwirt beschränkt und beim erkrankten Menschen nicht in Erscheinung tritt.

5.2 STEC O26, O103, O111, O145 und O157 in der Diagnostik

Die Bedeutung der STEC O26, O103, O111, O145 und O157 für den Menschen ist durch die Zahlen der letzten Jahre belegt. Nicht nur in Deutschland, sondern auch weltweit finden nicht-O157 Serogruppen dabei zunehmende Beachtung. Von mehreren Autoren wird deshalb seit einiger Zeit auf die oftmals einseitige STEC-Analytik verschiedener Staaten wie z. B. den USA oder Großbritannien hingewiesen (JENKINS et al. 2008; EFSA 2009; BETTELHEIM 2012; CHASE-TOPPING et al. 2012). Da vielerorts kulturell selektiv nach STEC O157 gesucht wurde, gerieten andere hochvirulente STEC-Stämme in den Hintergrund. Mittlerweile setzt ein Umdenken ein und Shigatoxin(gen)-basierte Nachweisverfahren ermöglichen die Detektion aller STEC unabhängig von der Serovar (STIGI et al. 2012). Aktuell publizierte die ISO mit der Norm ISO/TS 13136:2012 einen Real-Time PCR-Nachweis der *E. coli*-Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157 aus Lebensmittelproben anhand der Primer- und Sondensequenzen von PERELLE et al. (2004, 2005), welche auch dieser Arbeit zugrunde liegen. STEC-Stämme aus Lebensmitteln, die sowohl das *eae*-Gen als auch einer der oben genannten fünf Serogruppen zugehören,

werden dieser ISO-Norm zufolge als „hochpathogen“ für den Menschen beurteilt. STEC im Allgemeinen gelten im Gegensatz dazu als „pathogen“, und potenziell in der Lage, schwere Erkrankungen zu verursachen. Diese Aussage unterstreicht die Bedeutung der fünf STEC-Serogruppen für den erkrankten Menschen und stellt einen Fortschritt dar, vor allem in Bezug auf die vorherige Fokussierung auf STEC O157.

Für die Epidemiologie ist die Serotypisierung zweifelsohne ein wichtiges Instrument, es stellt sich aber die Frage, ob eine daraus abgeleitete Differenzierung zwischen hochvirulenten und lediglich virulenten STEC-Stämmen sinnvoll ist? Welche Konsequenzen ergeben sich für die Lebensmittelhersteller, die betroffenen Patienten oder die diagnostische Praxis, wenn ein STEC-Stamm zu einer der fünf Serogruppen gehört und ist demnach ein Einsatz der etablierten Pentaplex Real-Time PCR in der Routinediagnostik sinnvoll?

Da STEC laut aktueller Rechtslage in verzehrsfertigen Lebensmitteln als gesundheitsschädliche Erreger gelten, macht eine Virulenzdifferenzierung für Lebensmittelunternehmer keinen Unterschied, denn diese Lebensmittel werden grundsätzlich als nicht sicher beurteilt und dürfen nach § 5 des *Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuchs* (LFGB) sowie Artikel 14 Absatz 1 in Verbindung mit Absatz 2a der VO (EG) Nr. 178/2002 nicht in den Verkehr gebracht werden. Ebenso nimmt das Ergebnis bisher keinen Einfluss auf die Maßnahmen nach dem IfSG bei erkrankten Patienten oder asymptomatischen Ausscheidern und die Therapie Betroffener ist vorrangig abhängig vom individuellen Infektionsverlauf und nicht vom STEC-Subtyp. Gemeinhin wird von Antibiotika, insbesondere von bakterizid wirkenden, abgeraten, da die Gefahr einer erhöhten Stx- sowie Endotoxin-Freisetzung aus abgetöteten STEC besteht (GOLDWATER und BETTELHEIM 2012). In einer Studie zum EHEC O104:H4-Ausbruch 2011 zeigte sich jedoch, dass eine aggressive Antibiotika-Gabe keine negativen Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf hatte, weshalb weitere Untersuchungen zum Einsatz von Antibiotika vonnöten sind (MENNE et al. 2012).

Unabhängig von der Lebensmittelindustrie, der Therapie bzw. den rechtlichen Maßnahmen im Rahmen einer EHEC-Infektion ist das Wissen um einen hochvirulenten STEC-Stamm in der diagnostischen Praxis aber in Bezug auf die Prognose eines Patienten interessant, da rund 94 % der HUSEC-Stämme aus der Stammsammlung des *Konsiliarlabors für Hämolytisch-Urämisches Syndrom (HUS)* am Institut für Hygiene der Universität Münster zu den Serogruppen O157 (68 %), O26, O103, O111 und O145 gehören. Der Einsatz des Serogruppen-Nachweis' in der Routinediagnostik am LGL, Oberschleißheim, empfiehlt sich demnach am ehesten für die besonders HUS-gefährdete Altersgruppe der Kleinkinder bis zu 5 Jahren und könnte somit durch erhöhte Aufmerksamkeit ein möglichst frühzeitiges Eingreifen bei ersten Symptomen unterstützen.

5.2.1 Serologischer und molekularbiologischer *E. coli* Serogruppen-Nachweis

Bisher erfolgte die Serotypisierung von *E. coli* meist durch Agglutinationsverfahren (Objektträger, Mikrotiterplatte) mittels Anti-O-Seren (FRUTH 2005; BfR 2012b). Hierbei ist es oft nicht möglich eine O-Gruppe eindeutig zu bestimmen (Ont) oder die phänotypische Ausprägung einer O-Gruppe ist nicht vorhanden (Orf). In Bezug auf EHEC-Ausbrüche müssen epidemiologische Zusammenhänge jedoch erfasst werden, um die Quelle und Verbreitung des Erregers nachzuvollziehen (RKI 2012a). Molekularbiologische Nachweise sind dabei spezifischer als Agglutinationsverfahren, denn der Genotyp, d. h. das O-gruppen-spezifische Gen ist in der Regel auch bei Orf- und Ont-Stämmen vorhanden. Somit lässt sich die O-Serogruppe anhand der PCR-Methode auch nach phänotypischen Veränderungen des Erregerstammes weiterhin bestimmen (BEUTIN et al. 2009). FRIEDRICH (2011) betont die nötige Entwicklung von schnellen Sero- und Pathotypisierungsverfahren in Bezug auf HUS-assoziierte *E. coli*, da viele Labore aufgrund des hohen Zeitaufwands keine Serotypisierung durchführen. Die hier beschriebene Real-Time PCR-Methode eignet sich vor allem für größere Labore, denn es müssen Real-Time PCR-Geräte und Reagenzien bereitgestellt werden. Das ist insgesamt kostenintensiver als die klassische Agglutinationsdiagnostik, spart aber enorm Zeit. Besonders effizient ist hierbei die

Pentaplex Real-Time PCR, denn es können große Probenmengen zeitgleich auf fünf verschiedene Zielgene hin untersucht werden.

5.2.2 Real-Time PCR-Systeme

Am LGL, Oberschleißheim, wurde im Rahmen dieser Studie der Nachweis von *E. coli* O26, O103, O111, O145 und O157 aus Bakterienisolaten mittels Singleplex und Pentaplex Real-Time PCR-Systemen etabliert. Dabei ist es entsprechend der momentanen Vorgehensweise wichtig eine definierte Reihenfolge in der STEC-Diagnostik einzuhalten: Aus Mischkulturproben wird zunächst ein *stx*-positives Isolat gewonnen und als *E. coli* bestätigt, dann erst ist auch das Serotypisierungsergebnis aussagekräftig. Wird diese Abfolge missachtet, kann es zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Zum einen können auch andere Bakterienspezies Shigatoxine produzieren, zum anderen kommen die oben genannten Serogruppen nicht ausschließlich bei STEC, sondern ebenfalls bei anderen *E. coli* und Bakterienspezies vor (MAURO und KOUDELKA 2011; siehe Abschnitte 2.4.1.1 und 5.3).

5.2.2.1 *E. coli* O103-Sonde

Die modifizierte Sondensequenz der *E. coli* O103-Sonde bewährte sich in allen oben genannten Testreihen. Im Gegensatz zu den Studien von PERELLE et al. (2005) und BEUTIN et al. (2009) war es mit der Originalsequenz anfänglich zu späten C_t-Werten und niedrig verlaufenden Amplifikationskurven in der Real-Time PCR gekommen. Nach Verlängerung der Sondensequenz traten diese Probleme nicht mehr auf.

5.2.2.2 Validierung der Real-Time PCR-Systeme

5.2.2.2.1 Selektivität

Die Norm ISO 22118:2011 gibt vor, wenn vorhanden, 50 Stämme des Ziel-Mikroorganismus‘ für die Inklusivitätstests einzusetzen. In der vorliegenden Arbeit wurde die **Inklusivität** anhand von 50 *E. coli*-Stämmen der Serogruppen O26, O103, O145 und O157 sowie allen 25 *E. coli*-Stämmen der Serogruppe O111, die in der Stammsammlung des LGL, Oberschleißheim, verwahrt werden, getestet. Dabei wurden vorwiegend Stämme der Serovaren O26:H11, O103:H2, O111:H-, O145:H- und O157:H-/H7 eingesetzt, die zu den 10 häufigsten EHEC-Serovaren in Bayern gehören. Zudem wurden einzelne H-Antigenvarianten dieser Stämme getestet (O26:H-, O103:H11, O103:H25, O111:H8 und O145:Hnt). Die O-Gruppen aller untersuchten STEC-Stämme konnten anhand der zugehörigen Real-Time PCR-Systeme korrekt identifiziert werden. Dabei stimmt die Selektivität des Nachweises von *E. coli* O26, und O111 mit den Ergebnissen von BEUTIN et al. (2009) überein, welche in ihren Studien ebenfalls die Primer- und Sondensequenzen von PERELLE et al. (2004, 2005) einsetzten und für beide Nachweissysteme eine hohe Spezifität attestierten. BEUTIN et al. (2009) und auch BUGAREL et al. (2011) beschreiben jedoch Abweichungen beim Nachweis der Serogruppe O145. Ausschließlich die Serovar O145:H28 ließ sich anhand der Sonde und des Primerpaars von PERELLE et al. (2004) nachweisen. Andere H-Antigenvarianten (O145:H2, H4 oder H34) sind den Autoren zufolge in der PCR negativ. Diese Angabe konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da kein entsprechendes O145-Isolat vorlag und alle getesteten Stämme der Serovar O145:H- in den PCR-Systemen positiv waren. Letzteres lässt sich mit den Aussagen von BEUTIN (2011) und BUGAREL et al. (2011) vereinbaren, da SONNTAG et al. (2004) STEC-Stämme der Serovar O145:H- untersuchten und beim deutlich überwiegenden Anteil die Serovar H28 molekularbiologisch nachweisen konnten. Somit ist es wahrscheinlich, dass die STEC O145:H- des LGL, Oberschleißheim, ebenfalls der genetischen Serovar O145:H28 angehören. In einer weiteren

Studie wurden die Serovaren O26:H11/H- gleichfalls als Klone identifiziert (BETTELHEIM 2007).

Die **Exklusivität** wurde in dieser Studie anhand von 95 *E. coli*-Stämmen anderer Serogruppen und 44 *Enterobacteriaceae*-Stämmen beurteilt, womit die Vorgabe der ISO-Norm 22118:2011 von mindestens 30 eng und nicht eng verwandten nicht Ziel-Bakterienstämmen erfüllt ist. Da es sich bei ISO 22118:2011 jedoch um eine Norm zum Nachweis von Keimen aus Lebensmittelproben handelt und im LGL, Oberschleißheim, vorwiegend humane Stuhlproben auf EHEC untersucht werden, wurden anstatt der angegebenen lebensmittelrelevanten Keime *Enterobacteriaceae* zur Ermittlung der Exklusivität verwendet. Die Ergebnisse dieser Arbeit wichen bezüglich der *E. coli*-Serogruppen O111 und O157 von den Angaben von BEUTIN et al. (2009) ab, die keines der fünf O-Serogruppen-Zielgene bei anderen *Enterobacteriaceae*-Stämmen fanden. Ein *Shigella* sp.-Stamm (LGL 2869) zeigte sich in der EcS-PCR *wbd1_{O111}*-positiv und ein *Serratia entomophila*-Stamm war *rfbE_{O157}*-positiv. Somit sind diese Nachweissysteme nicht spezifisch für *E. coli* O111 bzw. *E. coli* O157. *Shigella* sp. und *E. coli* sind eng miteinander verwandt. Ihre O-Antigene können serologisch teilweise nicht voneinander unterschieden werden und LIU et al. (2008) zeigten, dass bei vielen *Shigella* spp.-Stämmen auch das O-Antigen-Gencluster mit dem von *E. coli* übereinstimmt. Andere *Enterobacteriaceae* - wie z. B. *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella* oder *Klebsiella* spp. – teilen ebenfalls O-Antigene mit *E. coli* (STENUTZ et al. 2006). Aufgrund dessen kann die Virulenz von STEC nur dann beurteilt werden, wenn ein Isolat vorliegt.

5.2.2.2.2 Sensitivität, Richtigkeit und Präzision

Zur Beurteilung der Qualität eines PCR-Systems eignen sich die **PCR-Effizienzen und R²-Werte** der Standardkurven aus DNA-Verdünnungsreihen. Erstere geben Aufschluss über die Amplifikationseffizienz des Real-Time PCR-Systems und sollten zwischen 90 und 110 % liegen (STEPHENSON 2010). Letztere stehen für den linearen Zusammenhang von eingesetzter DNA-Konzentration und gemessenem C_t-Wert und sollten $\geq 0,98$ liegen (NOLAN et al. 2007). Sowohl das

Pentaplex PCR-System als auch die Singleplex PCR-Systeme zeigten konstant hohe PCR-Effizienzen und R^2 -Werte im Rahmen dieser Vorgaben. Die **Nachweisgrenzen** der Singleplex und Pentaplex PCR-Systeme liegen bei 40 bis 400 Genomkopien pro Reaktionsansatz bzw. bei 100 fg bis 1 pg DNA/ μ l. Hierbei zeigte sich auch, dass das Pentaplex PCR-System trotz der zusätzlichen Primer und Sonden im PCR-Ansatz nicht weniger sensitiv ist, als die Singleplex PCR-Systeme. Jedoch sind die Nachweisgrenzen beider Systeme deutlich höher als die von PERELLE et al. (2004, 2005) publizierten - wobei ein direkter Vergleich der Ergebnisse aufgrund verschiedener Messmethoden nicht möglich ist. PERELLE et al. (2004, 2005) verwendeten zur Bestimmung der Sensitivität Plasmid-DNA und ein Fluorimeter. Die in dieser Studie eingesetzte spektrophotometrische Messung am NanoDropTM-Gerät ergab nach eigenen Versuchen deutlich höhere Nukleinsäure-Konzentrationen (bis zu fünffach höher) als eine fluorimetrische PicoGreen®-Messung (Invitrogen) derselben Probe. Der PicoGreen®-Fluoreszenzfarbstoff lagert sich fast ausschließlich an doppelsträngige DNA an, während die spektroskopische Messung auch Einzelstrang-DNA, RNA und Nucleotide misst, was ein Grund für die unterschiedlichen Nachweisgrenzen sein könnte (INVITROGEN 2008). Für den Anwendungsbereich der PCR-Systeme am LGL, Oberschleißheim, sind die Nachweisgrenzen dieser Studie akzeptabel. Im Rahmen der Sensitivitätsbestimmung wurde auf eine Messung mit lebensmittelrelevanter, bakterieller Hintergrundflora oder von verschiedenen Lebensmittelkategorien – wie in der Norm ISO 22118:2011 vorgegeben - verzichtet, da am LGL, Oberschleißheim, ausschließlich Isolate und wie bereits zuvor erwähnt überwiegend humane Stuhlproben auf die fünf *E. coli*-Serogruppen hin untersucht werden. Angaben zur **Richtigkeit** der Nachweismethode wurden anhand von vergleichenden Messungen zwischen Referenzstämmen und anderen *E. coli*-Stämmen der gleichen Serogruppen erhoben. Alle eingesetzten Ziel-Bakterienstämmen wurden ihrem Referenzstamm entsprechend nachgewiesen. Die **Präzision** der etablierten Real-Time PCR-Systeme lag bei Variationskoeffizienten von 0,2 bis 3,3 % bei den Singleplex PCR-Systemen und 0,4 bis 2,5 % beim Pentaplex PCR-System. Es ist deshalb

von einer insgesamt hohen Reproduzierbarkeit auszugehen, was für eine potenziell routinemäßig eingesetzte und diagnostische Nachweismethode äußerst wichtig ist. Zu beachten ist dabei, dass die Präzision nahe der Nachweisgrenze in der Regel geringer war, als bei höheren DNA-Konzentrationen.

5.2.2.2.3 Kontrollen

Der Norm ISO 22118:2011 zufolge sollen positive und negative PCR-Kontrollen sowie eine externe oder interne Amplifikationskontrolle eingesetzt werden. In dieser Studie wurde auf eine Amplifikationskontrolle verzichtet, da es bei kulturell angezüchteten Bakterienstämmen erfahrungsgemäß nicht zu einer PCR-Inhibition kommt.

5.3 Stx-negative Mischkulturen

Die Untersuchung von 100 stx-negativen, humanen Stuhlproben-Mischkulturen zeigte, dass die O-Serogruppen O145 und O157 in solchen Proben zu finden sind. Die Zuordnung zu einer Bakterienspezies war aufgrund der fehlenden Keimisolierung nicht möglich. Da das Pentaplex PCR-System in dieser Studie für Keimisolate validiert wurde, können die Ergebnisse aus Mischkulturen nur die grundsätzliche Fähigkeit des Serogruppennachweises in Gegenwart von Hintergrundkeimflora bestätigen. Sie ermöglichen jedoch keine Beurteilung der Nachweis-sensitivität und -spezifität. Es ist - wie bereits in Abschnitt 2.4.1.1 beschrieben - möglich, dass es sich bei den nachgewiesenen Genen um solche aus *E. coli* oder anderen *Enterobacteriaceae*-Gattungen handelt. Da im Rahmen dieser Studie das *wbd1*_{O111}-Gen bei einem *Shigella* sp.-Stamm und das *rfbE*_{O157}-Gen bei einem *Serratia entomophila*-Stamm nachgewiesen wurde, ist nicht auszuschließen, dass auch die restlichen Serogruppen-Gene bei anderen *Enterobacteriaceae* zu finden sind. Hierzu wären weitere und vor allem umfangreichere Untersuchungen von *Enterobacteriaceae*-Stämmen vonnöten. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um *E. coli*-Serogruppen handelt, ist allerdings hoch. Hierbei können die nachgewiesenen Serogruppen O145 und O157 von ehemaligen STEC, anderen *E. coli*-Pathovaren oder avirulenten *E. coli* stammen.

Es gilt dabei zu bedenken, dass es sich bei den vorliegenden Proben um Mischkulturen aus EHEC-verdächtigen Stuhlproben handelt. In der Literatur wird der Verlust und Zugewinn von *stx*-Genen im Laufe einer EHEC-Infektion oder während der Kultivierung beschrieben (FRIEDRICH et al. 2007; BIELASZEWSKA et al. 2007b; BIELASZEWSKA et al. 2008; MELLMANN et al. 2008b; ROUNDS et al. 2012). MELLMANN et al. (2008b) vermuten eine natürliche „*stx*-negative Phase“ im Lebenszyklus von sorbitfermentierenden *E. coli* O157:H-, da diese in Isolaten aus Tieren häufiger *stx*-negativ als *stx*-positiv sind. KONCZY et al. (2008) gehen von einem Selektionsvorteil aus, wenn ein Bakterienstamm in der Lage ist seine Virulenz zu verringern. Solche Fälle könnten in der aktuellen EHEC-Diagnostik jedoch übersehen werden, da bei *stx*-negativen *E. coli* (außer EPEC bei Kindern unter 2 Lebensjahren) keine weiteren Analysen folgen. Die Serovaren O26:H11/H-, O103:H2/H-, O145:H28/H- und O157:H7/H- werden nur selten beim gesunden Menschen nachgewiesen, sind aber gemeinsam mit der Serovar O111:H8/H- beim EHEC-erkrankten Menschen am häufigsten zu finden (BIELASZEWSKA et al. 2007a; eigene Daten). BIELASZEWSKA et al. (2007a) zeigten in einer Studie, dass jeder zehnte HUS-Patient keine EHEC, dafür aber EHEC-LST (EHEC that lost Shiga toxin) ausscheidet und dass solche EHEC-LST-Stämme in ihren restlichen Virulenzgenen mit den entsprechenden EHEC-Stämmen übereinstimmen. Damit besteht die Gefahr einer Fehldiagnose bzw. Fehlinterpretation der epidemiologischen Zusammenhänge.

In diesem Zusammenhang ist eine weitere Validierung der Real-Time PCR zum Nachweis der Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157 in Mischkulturen sinnvoll, denn somit könnten auch potenzielle EHEC-LST-Stämme detektiert werden.

5.4 Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Studie wurde gezeigt, dass die EHEC-Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157 auch in Bayern beim Menschen eine bedeutende Rolle einnehmen. Wiederkäuer bestätigten sich dabei als wichtige Reservoirwirte und können eine Vielzahl verschiedener STEC-Stämme in sich tragen. Vor allem in Rinderkot, aber auch in Schlachtkörper- und Lebensmittelproben konnten vereinzelt die für den Menschen potenziell hochvirulenten STEC der Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157 nachgewiesen werden. Der Nachweis dieser Serogruppen aus Probenisolaten ermöglicht es zum einen, die epidemiologischen Zusammenhänge einer Infektion zu erfassen. Zum anderen wird damit eine differenziertere STEC-Diagnostik im Sinne der Norm ISO/TS 13136:2012 durchgeführt. Dabei ist gleichwohl zu beachten, dass kein direkter Rückschluss von einer bestimmten Serogruppe auf die Virulenz eines *E. coli*-Stammes möglich ist. Humanvirulente STEC beschränken sich nicht ausschließlich auf Stämme der Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157, jedoch werden die häufigsten Verursacher schwerer Erkrankungsverläufe mit diesen fünf Serogruppen zumeist abgedeckt. Real-Time PCR-Verfahren eignen sich aufgrund ihrer höheren Spezifität gegenüber serologischen Verfahren, der zuverlässigen Detektion und der schnelleren Analyse (auch im Vergleich mit konventioneller PCR) besonders, sind aber kostenintensiver als Agglutinationsseren. Laboratorien mit großem Probenumfang profitieren von dem deutlichen Zeitvorteil, den (Multiplex) Real-Time PCR-Systeme gegenüber Agglutinationsverfahren und auch im Vergleich mit konventioneller PCR bieten.

Zukünftig ist nun eine erweiterte STEC-Diagnostik anhand der etablierten Pentaplex Real-Time PCR (EcS-PCR) möglich. Im Anschluss an den positiven *stx*-Nachweis und die Bestätigung von *E. coli* können somit die fünf wichtigsten, erkrankungsassoziierten STEC-Serogruppen entsprechend der Norm ISO/TS 13136:2012 nachgewiesen werden.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) gehören zu den wichtigen, lebensmittelassoziierten Erregern von Gastroenteritiden. Schwere Erkrankungsverläufe, wie die postinfektiöse Komplikation HUS sind bekannt und betreffen meist Kinder unter 5 Lebensjahren. Als Primärquelle gelten Wiederkäuer, in deren Gastrointestinaltrakt das natürliche Habitat von Shigatoxin-bildenden *E. coli* liegt. Über fäkale Kontamination von Lebensmitteln, Wasser oder auch direkten Kontakt können STEC oral vom Menschen aufgenommen werden, wobei nicht alle STEC gleich virulent sind. Manche, wie z. B. die der Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157 werden wesentlich häufiger bei erkrankten Menschen nachgewiesen als andere.

Ziel dieser Studie war es zum einen fünf Singleplex Real-Time PCR-Systeme und ein Pentaplex Real-Time PCR-System zum Nachweis der oben genannten fünf *E. coli*-Serogruppen am LGL, Oberschleißheim, zu etablieren. Die in der Norm ISO/TS 13136:2012 als „hochpathogen“ eingestuften STEC-Stämme können somit anhand der dort beschriebenen Primer- und Sondensequenzen aus Probenisolaten detektiert werden. Für die Validierung wurden die Selektivität, Sensitivität, Präzision und Richtigkeit der PCR-Systeme bestimmt. Zum anderen wurden die Daten von 8272 humanen Proben (einschließlich der des EHEC O104:H4-Ausbruchs von 2011), 1521 Lebensmittelproben, 240 Tierkotproben, 69 Schlachtkörperproben und 29 Wasserproben aus den Jahren 2009 bis 2011 aus Bayern sowie die STEC-Serotypisierungsergebnisse von 09/2004 bis 12/2011 ausgewertet und beschrieben.

Im Vergleich mit der gängigen Serotypisierung mittels Agglutination bietet das Real-Time PCR-Verfahren insbesondere bei großem Probenumfang einen enormen Zeitvorteil. Das Pentaplex PCR-System ermöglicht zudem eine zeitgleiche Analyse von Probenisolaten auf alle fünf Serogruppen. Alle *E. coli*-Stämme der Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157 wurden durch die PCR-Systeme korrekt nachgewiesen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die O103-Sondensequenz wurde hierfür zuvor modifiziert. Die Spezifität der Nachweissysteme für O26, O103 und O145 lag in Bezug auf *E. coli* bei 100 %. Bei den Nachweissystemen für O111 und O157 zeigten auch Bakterienstämme anderer Gattungen ein positives Ergebnis in der PCR (*Serratia entomophila* / *rfbE*_{O157}-positiv und *Shigella* sp. LGL 2869 / *wbd1*_{O111}-positiv).

Die Datenauswertung ergab unter anderem einen hohen Anteil *stx*-positiver Tierkot- und Schlachtkörperproben von Rindern. Die meisten *stx*-positiven Lebensmittel stammten von Wiederkäuern. Vereinzelt waren auch potenziell humanvirulente STEC nachzuweisen. Der Großteil der nicht-humanen Proben war weder *eae*- noch *EhlyA*-positiv, während nur ein Viertel der humanen Proben keines der beiden Gene aufwies. Bei humanen Proben dominiert die Gruppe der unter 1 bis 5-jährigen Erkrankten und Frauen sind häufiger betroffen als Männer. Die *E. coli*-Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157 gehören zu den häufigsten in Bayern und 2011 infizierten sich 47 Menschen in Bayern mit EHEC O104:H4.

VII SUMMARY

Enterohemorrhagic *E. coli* belong to the important, food-associated pathogens that cause gastrointestinal infections. Serious courses of disease such as the postinfectious complication HUS are well known and majorly affect children below the age of five. Ruminants are considered as primary source and their gastrointestinal tract is the natural habitat of Shigatoxin-producing *E. coli*. STEC can be ingested by humans through faecal contamination of food and water but also through direct contact, even though not all STEC show the same degree of virulence. Some of them, for instance those belonging to the serogroups O26, O103, O111, O145 and O157, are considerably more frequently detected in sick humans than others.

On the one hand, the aim of this study at the LGL, Oberschleißheim, was to establish both, five Singleplex real-time PCR-systems and one Pentaplex real-time PCR-system in order to detect the five *E. coli* serogroups mentioned above. This enables to detect the strains of *E. coli*, which according to ISO/TS 13136:2012 are rated “highly pathogenic” to humans by means of primer and probe sequences described in this ISO technical specification. Selectivity, sensitivity, precision, and trueness of the real-time PCR-systems were determined for validation. On the other hand, data of 8.272 human samples (including those belonging to the outbreak of EHEC O104:H4 in 2011), 1.521 food samples, 240 samples of animal faeces, 69 samples of carcasses, and 29 samples of water (from 2009 until 2011) as well as the results of STEC-serotyping, conducted between 09/2004 and 12/2011, were evaluated and described.

In comparison with common serotyping through agglutination, real-time PCR offers a decisive time advantage, especially in terms of handling larger amounts of samples. In addition, the Pentaplex PCR-system enables a simultaneous analysis of sample isolates on all five serogroups. All *E. coli* strains that belong to the serogroups O26, O103, O111, O145 and O157 were detected correctly through the PCR-systems.

SUMMARY

The probe sequence of O103 was previously modified for this purpose. The specificity of the O26, O103 and O145 detection systems was referring to *E. coli* equivalent to 100 percent. But the detection systems for O111 and O157 showed positive results in bacterial strains of different genera (*Serratia entomophila* / *rfbE*_{O157}-positive and *Shigella* sp. LGL 2869 / *wbd1*_{O111}-positive).

Data evaluation showed a high share of *stx*-positive bovine faeces and carcasses samples. Most of *stx*-positive food is originated in ruminants. Occasionally STEC that are potentially human pathogenic were detected. The bulk of non-human samples were neither *eae*- nor *EhlyA*-positive, whereas only a quarter of the human samples showed none of these two genes. Among the human samples those patients less than one to five years of age prevailed, and women were more often affected than men. The *E. coli* serogroups O26, O103, O111, O145 and O157 belong to the most common in Bavaria and in 2011 47 people were infected with EHEC O104:H4.

VIII ANHANG

8.1 Material und Methoden

8.1.1 Geräte

- Brutraum (37 °C ± 2)
- Bunsenbrenner: gasprofi2, WLD-Tec, Göttingen
- Gefrierschrank (- 20 °C ± 2) z. B. Comfort No Frost, Liebherr, Ochsenhausen
- Gefrierschrank (- 80 °C ± 5): Hera freeze, Heraeus, Hanau
- Kühlschrank (4 °C ± 2) vgl. Gefrierschrank (- 20 °C ± 2)
- Multiplex PCR Geräte und Software:
Agilent Technologies, Inc., Santa Clara (CA), USA
 - Mx3000P: 4 Messkanäle (Singleplex PCR-Systeme)
 - Mx3005P: 5 Messkanäle (Pentaplex PCR-System)
- Spektralphotometer:
NanoDrop™ ND-1000, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
- Sterilwerkbank:
Hera safe, Heraeus (Kendro Laboratory Products), Hanau
- eppendorf Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg
- Vortex-Mixer Zx³, VELP Scientifica, Usmate, Italien
- Zentrifuge für Reaktionsgefäße:
eppendorf Centrifuge 5417 R, Eppendorf AG, Hamburg
- Zentrifuge für Mikrotiterplatten:
Universal 320, Andreas Hettich GmbH&Co.KG, Tuttlingen
- Kolbenhubpipetten:
eppendorf Reference®, Eppendorf AG, Hamburg
 - 0,5 – 10 µl Artikelnr. 4910 000.018
 - 10 – 100 µl Artikelnr. 4910 000.042
 - 50 – 200 µl Artikelnr. 4910 000.093
 - 100 – 1000 µl Artikelnr. 4910 000.069

8.1.2 Verbrauchsmaterialien

- Abklebefolie: MicroAmp® Optical Adhesive Film, Applied Biosystems, Carlsbad (CA), USA, Artikelnr. 4360954
- Einmalhandschuhe:
 - Gentle Skin® grip, puderfrei, Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden, Artikelnr. 1221GRIP
 - Nitril 3000, siehe oben, Artikelnr. 1280S

- Filter- und Sammelgefäße: High Pure Filter Tubes with two layers of glass fibre fleece, Collection Tubes, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim (siehe Extraktionskit)
- Kryoröhrchen Cryobank™ - rot, Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld, Artikelnr. 291701
- Metallnadeln, steril
- Metallösen, steril
- Mikrotiterplatten: MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Carlsbad (CA), USA, Artikelnr. N8010560

- Pipettenspitzen: ep Dualfilter T.I.P.S®, Eppendorf AG, Hamburg
 - 0,1 – 10 µl Artikelnr. 0030 077.504
 - 0,5 – 20 µl Artikelnr. 0030 077.530
 - 2 – 100 µl Artikelnr. 0030 077.547
 - 2 – 200 µl Artikelnr. 0030 077.555
 - 50 – 1000 µl Artikelnr. 0030 077.571

- Reaktionsgefäße: eppendorf Safe-Lock Gefäße™
 - 0,5 ml, PCR clean farblos Artikelnr. 0030 123.301
 - 0,5 ml, ambra Artikelnr. 0030 121.155
 - 1,5 ml, PCR clean farblos Artikelnr. 0030 123.328
 - 2,0 ml, PCR clean farblos Artikelnr. 0030 123.344

- Süsse Objektträger, Süsse Labortechnik, Gudensberg, Artikelnr. 07626
- Transportverpackung: Orange Top Bio-Bottle™ complete, Bio-Bottle New Zealand Ltd., Auckland
- Wasserfilter: Cellulose-Nitrat-(CN) Membranfilter, 0,45 µm, Sartorius AG, Göttingen, Best.nr. 11406—50-----R
- Wattetupfer, steril (autoklaviert)

8.1.3 Nährmedien

- Endo Agar, Oxoid GmbH, Wesel, Artikelnr. PO5005A
- GN-Bouillon (Gramnegativen-Bouillon) nach Hajna, BD, Heidelberg, Artikelnr. 248610
- Lactose TTC Agar mit Tergitol® 7, Merck KGaA, Darmstadt, Bestellnr. 1076800500
- mTSB (Angaben der Nährbodenküche des LGL, Oberscheißeheim)
 - 30,0g mTSB
 - 1,5g Gallensalze Nr. 3
 - 1,5g Dikaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄)
 - Aqua destillata ad 1000 ml
 - plus Novobiocin: 0,2 ml

- Novobiocin-Lösung, 20 mg/ml³, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- Mueller-Hinton-II-Agar, BD, Heidelberg, ArtikelNr. 225250
- PortagermTM Amies Agar + Wattetupfer, bioMérieux® SA, Marcy-l'Etoile, Frankreich, REF 41999

8.1.4 Reagenzien und Lösungen

- Anti-O157 K⁻ Coli-Testserum (EHEC), Siemens Healthcare, Erlangen, Bestellnr. OQMH05
- Deoxyribonucleic acid, Activated, Type XV, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, ArtikelNr. D4522-5MG
- Ethanol ≥ 99,8 %, DAB, reinst, Carl Roth GmbH+Co KG., Karlsruhe, ArtikelNr. 5054.3
- Extraktionskit:
High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Catalog No. 11796828001
 - Binding Buffer (pH 4,4 bei 25 °C)
 - 6 M Guanidin-HCl
 - 10 mM Harnstoff
 - 10 mM Tris-HCl
 - 20% Triton X-100 (v/v)
 - Proteinase K, recombinant PCR grade, gelöst in Aqua bidestillata
 - Inhibitor Removal Buffer
(pH 6,6 nach Zugabe von Ethanol, absolut bei 25 °C)
 - 5 M Guanidin-HCl
 - 20 mM Tris-HCl
 - Washing Buffer
(pH 7,5 nach Zugabe von Ethanol, absolut bei 25 °C)
 - 20 mM NaCl
 - 2 mM Tris-HCl
 - Elution Buffer (pH 8,5 bei 25 °C)
 - 10 mM Tris-HCl
- Isopropanol, absolut: 2-Propanol zur Analyse, Merck KGaA, Darmstadt, Bestellnr. 1.09634.1000

- Mastermix-Kit:
 QuantiTect® Multiplex RT-PCR NoRox Kit, Qiagen GmbH, Hilden,
 Catalog No. 204843
 - 2x QuantiTect® Multiplex RT-PCR NoRox Master Mix
 - QuantiTect® Multiplex RT Mix
 - RNase-Free Water
- NaCl-Lösung (0,9%): Isotonische Kochsalzlösung,
 Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, PZN 0809032
- PBS-Puffer: Phosphate Buffered Saline Solution, 10x concentrated,
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, P 5493-1L (mittels Aqua
 destillata verdünnt auf 1-fache Konzentration)
- Primer und Sonden:
 Eurofins MWG GmbH, Ebersberg;
 TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin; biomers.net, Ulm
- Steriles Wasser: Aqua ad iniectabilia,
 B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- Wasser (PCR-grade), Eurofins MWG GmbH, Ebersberg;
 TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin; biomers.net, Ulm

Tab. 8.1: Farbstoffe und Quencher

Farbstoff		Absorption	Emission	Hersteller
FAM™	Fluorescein	495 nm	520 nm	Applied Biosystems, Inc.
ATTO 425	-	436 nm	484 nm	ATTO-TEC GmbH
CY5™	-	649 nm	670 nm	GE Healthcare
HEX™	Hexachlor-fluorescein	535 nm	556 nm	Applied Biosystems, Inc.
Texas Red®	Sulfo-rhodamin	583 nm	603 nm	Molecular Probes (Invitrogen)

Quencher		Quenching-Bereich (Absorptionsmax.)	Hersteller
BBQ-650™	BlackBerry™ Quencher-650	550 bis 750 (650) nm	Berry&Associates, Inc.
BHQ-1™	Black Hole Quencher 1™	480 bis 580 (534) nm	Biosearch Technologies, Inc.
DDQ-I	Deep Dark Quencher-I	400 bis 520 (430) nm	Eurogentec

8.2 Ergebnisse

Tab. 8.2: Verteilung der EHEC-Erstfälle 2009 bis 2011

Probenmaterial	2009	2010	2011	Erstfälle 2009 - 2011
Stuhl	82	123	334	539
Bakterienstamm	-	-	119	19
Flüssigkultur	-	1	1	2
Sonstiges	-	-	2	2
Gesamtsumme	82	124	356	562

Tab. 8.3: Verteilung der Virulenzgene humaner Probenisolate in den Jahren 2009 bis 2011

Virulenzgene	2009	2010	2011	Gesamt	%
<i>stx1, eae, EhlyA</i>	15	26	29	70	18,9
<i>stx2, eae, EhlyA</i>	9	18	30	57	15,4
<i>stx1</i>	6	12	27	45	12,2
<i>stx1, EhlyA</i>	11	4	29	44	11,9
<i>stx1, stx2, EhlyA</i>	5	12	22	39	10,5
<i>stx2</i>	5	16	15	36	9,7
<i>stx2, EhlyA</i>	10	1	17	28	7,6
<i>stx1, stx2, eae, EhlyA</i>	5	3	11	19	5,1
<i>stx1, eae</i>	4	4	5	13	3,5
<i>stx1, stx2</i>		2	9	11	3,0
<i>stx2, eae</i>		2	6	8	2,2
	70	100	200	370	100

ANHANG

Tab. 8.4: EHEC-Serovaren (O:H) aus Bayern von 09/2004 bis 12/2011

Lauf. Nr.	Serovar	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Anzahl gesamt
1	O26:H11	5	11	15	17	10	8	10	20	96
2	O103:H2	1	14	6	7	12	6	7	15	68
3	O157:H-	2	13	11	3	6	2	2	10	49
4	O145:H-	1	6	7	3	-	2	7	22	48
5	O91:H-	2	7	2	12	8	6	5	5	47
6	O104:H4	-	-	-	-	-	-	-	47	47
7	Orf:H-	1	6	4	4	3	2	6	10	36
8	O157:H7	2	3	4	5	5	1	6	2	28
9	O111:H-	1	7	3	6	3	1	1	3	25
10	Ont:H-	1	7	1	1	4	-	3	5	22
11	O91:H14	-	3	5	3	2	2	-	5	20
12	Ont:Hnt	-	-	2	-	-	8	1	8	19
13	O146:H21	-	3	-	1	1	2	2	7	16
14	O177:H-	2	1	2	-	1	3	3	2	14
15	O26:H-	-	3	3	2	1	1	4	-	14
16	Orf:H2	-	2	3	2	2	-	2	3	14
17	O146:H-	-	-	3	2	-	-	4	3	12
18	O113:H4	3	2	-	2	1	2	1	-	11
19	O2:H6	-	2	1	-	6	-	1	1	11
20	O146:H28	-	1	1	-	1	-	6	1	10
21	Ont:H18	-	-	1	3	1	-	3	2	10
22	O55:Hnt	-	-	3	1	2	-	-	3	9
23	O128:H2	-	-	-	-	1	-	-	7	8
24	Ont:H16	1	-	2	1	1	3	-	-	8
25	Orf:H11	-	2	2	-	3	-	1	-	8
26	O74:H42	1	-	-	-	-	6	-	-	7
27	O76:H-	-	1	1	-	1	1	-	3	7
28	O80:H2	-	-	-	-	-	-	2	5	7
29	Ont:H7	-	-	1	5	1	-	-	-	7
30	Orf:H4	-	-	1	-	-	-	2	4	7
31	Orf:Hnt	-	5	-	1	-	-	1	-	7
32	O115:H10	-	-	4	-	-	-	-	1	5
33	O121:H19	-	-	-	3	-	-	-	2	5
34	Ont:H19	2	1	-	-	-	-	2	-	5
35	O177:H11	-	-	3	-	-	2	-	-	5
36	O8:Hnt	-	2	1	-	-	1	-	1	5
37	O154:H31	-	2	1	-	1	-	-	-	4
38	O156:H-	-	-	-	1	1	-	-	2	4
39	O179:H8	-	-	-	1	-	3	-	-	4

ANHANG

Tab. 8.4: EHEC-Serovaren (O:H) aus Bayern von 09/2004 bis 12/2011

Lauf. Nr.	Serovar	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Anzahl gesamt
40	O76:H19	-	1	1	2	-	-	-	-	4
41	O113:H-	-	-	1	1	-	-	-	1	3
42	O113:H21	-	-	-	-	2	-	-	1	3
43	O115:H-	-	3	-	-	-	-	-	-	3
44	O121:H-	-	-	-	1	-	-	2	-	3
45	O128:H-	-	-	-	1	-	-	2	-	3
46	O143:H4	-	-	2	-	-	-	-	1	3
47	O174:H8	-	-	2	-	-	-	-	1	3
48	O2:H-	-	3	-	-	-	-	-	-	3
49	O2:H27	-	3	-	-	-	-	-	-	3
50	O22:H8	-	1	2	-	-	-	-	-	3
51	O23:H21	-	1	-	-	-	-	2	-	3
52	O43:H2	-	-	-	-	-	-	-	3	3
53	O5:H-	-	-	-	1	-	1	-	1	3
54	O55:H7	-	2	-	-	-	-	-	1	3
55	O78:H-	-	-	-	-	3	-	-	-	3
56	O80:H-	-	-	1	-	1	-	-	1	3
57	O91:H21	-	2	-	-	-	-	-	1	3
58	Ont:H25	-	-	1	-	-	-	-	2	3
59	Ont:H28	-	1	1	-	-	1	-	-	3
60	Ont:H6	-	1	1	1	-	-	-	-	3
61	Orf:H19	-	1	2	-	-	-	-	-	3
62	O103:H11	1	-	-	1	-	-	-	-	2
63	O112:H-	-	-	2	-	-	-	-	-	2
64	O112:H8	-	-	-	-	-	-	1	1	2
65	O118:H16	1	-	-	-	-	-	1	-	2
66	O119:H4	-	1	1	-	-	-	-	-	2
67	O124:H30	-	-	-	-	-	-	-	2	2
68	O136:Hnt	-	1	1	-	-	-	-	-	2
69	O174:H2	1	-	-	-	-	1	-	-	2
70	O181:H16	-	-	-	2	-	-	-	-	2
71	O2:H32	-	-	1	1	-	-	-	-	2
72	O22:Hnt	-	-	-	-	2	-	-	-	2
73	O105:H18	-	-	-	-	-	-	-	2	2
74	O55:H6	1	-	-	-	-	-	-	1	2
75	O74:H-	-	-	2	-	-	-	-	-	2
76	O74:H27	-	2	-	-	-	-	-	-	2
77	O74:H28	-	1	1	-	-	-	-	-	2
78	O75:H55	-	2	-	-	-	-	-	-	2

ANHANG

Tab. 8.4: EHEC-Serovaren (O:H) aus Bayern von 09/2004 bis 12/2011

Lauf. Nr.	Serovar	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Anzahl gesamt
79	O8:H-	-	1	-	-	-	-	-	1	2
80	O8:H19	1	1	-	-	-	-	-	-	2
81	Ont:H11	1	1	-	-	-	-	-	-	2
82	Ont:H2	-	1	-	-	-	-	-	1	2
83	Ont:H21	-	1	-	-	-	1	-	-	2
84	Ont:H30	-	-	-	-	2	-	-	-	2
85	Ont:H31	1	-	1	-	-	-	-	-	2
86	Ont:H4	-	1	1	-	-	-	-	-	2
87	Ont:H48	-	-	1	-	-	-	-	1	2
88	O55:H31	-	-	-	1	-	-	-	-	1
89	O1:H-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
90	O1:H7	-	-	-	1	-	-	-	-	1
91	O1:Hnt	-	1	-	-	-	-	-	-	1
92	O10:H42	-	-	1	-	-	-	-	-	1
93	O100:H-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
94	O100:H16	-	-	-	-	-	-	-	1	1
95	O106:H-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
96	O106:H18	-	1	-	-	-	-	-	-	1
97	O111:H8	-	-	-	1	-	-	-	-	1
98	O113:H28	-	1	-	-	-	-	-	-	1
99	O116:H-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
100	O117:H4	-	-	-	-	1	-	-	-	1
101	O126:H33	-	-	-	1	-	-	-	-	1
102	O127:H40	-	-	-	1	-	-	-	-	1
103	O127:Hnt	-	-	-	1	-	-	-	-	1
104	O128:Hnt	-	-	-	-	-	-	-	1	1
105	O13:H4	1	-	-	-	-	-	-	-	1
106	O130:H-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
107	O130:H11	-	-	1	-	-	-	-	-	1
108	O136:H12	-	1	-	-	-	-	-	-	1
109	O136:H16	-	-	-	-	1	-	-	-	1
110	O138:H8	-	1	-	-	-	-	-	-	1
111	O140:H-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
112	O145:H28	-	-	1	-	-	-	-	-	1
113	O145:Hnt	1	-	-	-	-	-	-	-	1
114	O146:H31	-	-	-	-	1	-	-	-	1
115	O147:H21	-	-	1	-	-	-	-	-	1
116	O150:H-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
117	O153:Hnt	-	1	-	-	-	-	-	-	1

ANHANG

Tab. 8.4: EHEC-Serovaren (O:H) aus Bayern von 09/2004 bis 12/2011

Lauf. Nr.	Serovar	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Anzahl gesamt
118	O153:Hrf	-	1	-	-	-	-	-	-	1
119	O156:H25	-	-	-	1	-	-	-	-	1
120	O156:Hnt	-	-	-	-	-	-	-	1	1
121	O158:H-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
122	O168:H28	-	-	-	-	1	-	-	-	1
123	O171:H25	-	-	1	-	-	-	-	-	1
124	O174:H21	-	-	-	-	-	-	1	-	1
125	O175:H4	-	1	-	-	-	-	-	-	1
126	O175:H52	-	-	-	-	-	-	-	1	1
127	O176:H-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
128	O178:H-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
129	O18:H31	-	-	-	1	-	-	-	-	1
130	O181:H-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
131	O2:H4	-	-	1	-	-	-	-	-	1
132	O20:H30	-	-	-	1	-	-	-	-	1
133	O21:H-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
134	O21:H12	-	-	-	-	1	-	-	-	1
135	O21:H21	-	-	-	-	-	1	-	-	1
136	O21:H31	-	-	-	-	-	-	1	-	1
137	O22:H-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
138	O23:H-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
139	O23:H15	-	1	-	-	-	-	-	-	1
140	O23:H4	-	-	-	-	-	-	1	-	1
141	O25:H11	-	-	1	-	-	-	-	-	1
142	O28:Hnt	-	-	1	-	-	-	-	-	1
143	O38:H26	-	-	-	-	-	-	-	1	1
144	O51:H14	-	1	-	-	-	-	-	-	1
145	O54:H-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
146	O55:H12	-	-	-	-	-	-	1	-	1
147	O6:H1	-	-	-	-	-	-	1	-	1
148	O6:H10	-	-	-	-	-	-	-	1	1
149	O6:H31	-	-	1	-	-	-	-	-	1
150	O69:H-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
151	O74:H6	-	-	-	1	-	-	-	-	1
152	O74:Hnt	-	-	1	-	-	-	-	-	1
153	O76:H2	-	-	-	-	-	-	-	1	1
154	O76:H7	-	-	-	-	-	-	-	1	1
155	O76:Hnt	-	-	-	-	-	-	-	1	1
156	O77:H41	-	1	-	-	-	-	-	-	1

ANHANG

Tab. 8.4: EHEC-Serovaren (O:H) aus Bayern von 09/2004 bis 12/2011

Lauf. Nr.	Serovar	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Anzahl gesamt
157	O79:H14	-	-	-	-	-	-	1	-	1
158	O8:H4	-	-	-	1	-	-	-	-	1
159	O8:H8	-	-	1	-	-	-	-	-	1
160	O84:H-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
161	O91:H10	-	-	-	-	1	-	-	-	1
162	O92:H-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
163	O92:Hnt	-	-	-	-	-	1	-	-	1
164	Ont:H35	1	-	-	-	-	-	-	-	1
165	Ont:H38	-	-	-	-	-	1	-	-	1
166	Ont:H41	-	-	-	-	-	-	-	1	1
167	Ont:H45	-	-	-	1	-	-	-	-	1
168	Ont:H49	-	-	-	-	-	-	-	1	1
169	Orf:H13	-	-	1	-	-	-	-	-	1
170	Orf:H14	-	-	-	-	-	-	-	1	1
171	Orf:H21	-	-	1	-	-	-	-	-	1
172	Orf:H28	-	-	-	-	-	-	-	1	1
173	Orf:H29	-	-	-	1	-	-	-	-	1
174	Orf:H45	-	-	1	-	-	-	-	-	1
175	Orf:Hrf	-	1	-	-	-	-	-	-	1
176	O177:H21	-	-	-	-	-	-	-	1	1
177	O105:H-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
178	Ont:H27	-	-	-	-	-	-	-	1	1
179	O40:H16	-	-	-	-	-	-	-	1	1
180	Ont:H52	-	-	-	-	-	-	-	1	1
181	O118:H-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
182	O104:H7	-	-	-	-	-	-	-	1	1
183	O113:Hnt	-	-	-	-	-	-	-	1	1
184	O6:H-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
185	O8:H25	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Gesamtergebnis		36	150	134	112	97	70	100	247	946

ANHANG

Tab. 8.5: STEC-Serovaren (O:H) aus Lebensmitteln nicht tierischer Herkunft
(Südbayern, 09/2004 bis 12/2011)

Lauf. Nr.	Serovar	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Anzahl gesamt
1	O22:H8	-	-	-	-	1 ⁺	-	-	-	1
2	Ont:H-	-	-	-	-	1 [†]	-	-	-	1
3	Ont:H7	-	-	-	-	-	1 [‡]	-	-	1
Gesamtergebnis		0	0	0	0	2	1	0	0	3

⁺ Lindenblütentee, [†] Silberlindenblüten, [‡] Melissenblätter

Tab. 8.6: STEC-Serovaren (O:H) aus Lebensmitteln tierischer Herkunft
(Südbayern, 09/2004 bis 12/2011)

Lauf. Nr.	Serovar	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Anzahl gesamt
1	Ont:H-	1	4	3	6	1	4	1	1	21
2	O2:H32	-	5	2	-	-	-	-	-	7
3	Orf:H-	-	3	-	2	-	-	-	-	5
4	O21:H21	-	-	-	-	2	1	1	-	4
5	O22:H8	-	-	-	-	1	2	-	-	3
6	Ont:H11	-	2	-	1	-	-	-	-	3
7	O1:Hnt	-	1	-	-	-	1	-	-	2
8	O100:H-	-	1	-	1	-	-	-	-	2
9	O110:H31	-	-	-	2	-	-	-	-	2
10	O154:H31	-	2	-	-	-	-	-	-	2
11	O2:H-	-	-	-	1	-	-	-	1	2
12	O23:H21	-	1	-	-	-	1	-	-	2
13	O55:H31	-	2	-	-	-	-	-	-	2
14	O75:H8	-	-	-	2	-	-	-	-	2
15	O76:H19	-	2	-	-	-	-	-	-	2
16	O8:H19	-	-	-	-	1	-	-	1	2
17	O91:H-	1	-	1	-	-	-	-	-	2
18	Ont:H21	-	-	-	1	1	-	-	-	2
19	Ont:Hnt	-	-	-	-	1	-	1	-	2
20	Orf:H19	2	-	-	-	-	-	-	-	2
21	O103:H2	-	-	-	-	1	-	-	-	1
22	O113:H-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
23	O113:H21	1	-	-	-	-	-	-	-	1
24	O116:H21	-	-	-	-	-	-	1	-	1
25	O128:H-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
26	O128:Hnt	-	-	-	1	-	-	-	-	1
27	O130:H11	-	-	1	-	-	-	-	-	1
28	O136:H1	-	-	-	-	-	-	-	1	1
29	O141:H4	-	-	-	-	1	-	-	-	1
30	O146:H-	-	-	-	-	-	1	-	-	1

ANHANG

Tab. 8.6: STEC-Serovaren (O:H) aus Lebensmitteln tierischer Herkunft
(Südbayern, 09/2004 bis 12/2011)

Lauf. Nr.	Serovar	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Anzahl gesamt
31	O146:H21	-	-	-	-	-	1	-	-	1
32	O146:H28	-	-	-	1	-	-	-	-	1
33	O153:H-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
34	O157:H-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
35	O174:H21	-	-	-	-	-	1	-	-	1
36	O174:H8	-	1	-	-	-	-	-	-	1
37	O176:H-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
38	O178:H19	-	-	-	1	-	-	-	-	1
39	O179:H8	-	-	-	-	-	1	-	-	1
40	O2:H6	-	-	-	-	-	-	-	1	1
41	O23:H-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
42	O23:H8	-	-	-	-	1	-	-	-	1
43	O26:H11	-	-	-	-	1	-	-	-	1
44	O32:H40	-	-	-	-	-	1	-	-	1
45	O55:H12	-	1	-	-	-	-	-	-	1
46	O55:Hnt	-	-	-	-	1	-	-	-	1
47	O8:H4	-	-	-	1	-	-	-	-	1
48	O88:H25	-	-	-	-	-	1	-	-	1
49	O91:H38	-	-	-	-	-	1	-	-	1
50	Ont:H19	-	-	-	-	-	-	-	1	1
51	Ont:H28	-	-	-	-	-	-	-	1	1
52	Ont:H29	-	-	-	-	-	1	-	-	1
53	Ont:H30	-	-	-	-	1	-	-	-	1
54	Ont:H31	-	-	-	-	-	1	-	-	1
55	Ont:H45	-	-	-	1	-	-	-	-	1
56	Ont:H48	-	-	-	1	-	-	-	-	1
57	Ont:H7	1	-	-	-	-	-	-	-	1
58	Orf:H12	-	1	-	-	-	-	-	-	1
59	Orf:H21	-	-	-	-	1	-	-	-	1
60	Orf:H28	-	-	-	1	-	-	-	-	1
61	Orf:H43	-	-	-	1	-	-	-	-	1
62	Orf:H8	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Gesamtergebnis		6	27	7	26	16	19	4	8	113

Tab. 8.7: STEC-Serovaren (O:H) in Schlachtkörperproben
aus Südbayern 09/2004 bis 12/2011

Lauf. Nr.	Serovar	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Anzahl gesamt
1	O8:H19	-	-	-	-	-	3	-	1	4
2	O113:H21	-	-	-	-	-	1	-	-	1
3	O174:H21	-	-	-	-	-	1	-	-	1
4	O2:H25	-	-	-	-	-	1	-	-	1
5	O23:H31	-	-	-	-	-	1	-	-	1
6	O40:H19	-	-	-	-	-	1	-	-	1
7	O55:H31	-	-	-	-	-	1	-	-	1
8	O55:Hnt	-	-	-	-	-	1	-	-	1
9	O8:Hnt	-	-	-	-	-	1	-	-	1
10	O86:H-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
11	Ont:H-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
12	Ont:H16	-	-	-	-	-	1	-	-	1
13	Ont:H8	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Gesamtergebnis		0	0	0	0	0	15	0	0	16

Tab. 8.8: STEC-Serovaren (O:H) in Tierkotproben aus Südbayern
09/2004 bis 12/2011

Lauf. Nr.	Serovar	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Anzahl gesamt
1	O91:H21	2	1	1	4	2	-	-	-	10
2	Ont:H-	3	1	-	-	4	-	1	1	10
3	O145:H-	-	2	-	4	-	-	-	-	6
4	O179:H8	-	2	2	1	-	-	-	-	5
5	Ont:H2	-	2	1	-	1	-	-	-	4
6	Ont:H8	-	1	-	-	1	-	-	2	4
7	O15:H16	-	-	-	3	-	-	-	-	3
8	O174:H21	-	-	-	-	1	-	1	1	3
9	O5:H-	1	-	-	-	2	-	-	-	3
10	O55:Hnt	-	-	3	-	-	-	-	-	3
11	Orf:H-	-	1	2	-	-	-	-	-	3
12	O103:H12	-	-	-	-	2	-	-	-	2
13	O113:H21	1	-	-	-	-	-	-	1	2
14	O113:H4	-	-	-	-	1	-	-	1	2
15	O116:H21	2	-	-	-	-	-	-	-	2
16	O150:H-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
17	O153:H25	2	-	-	-	-	-	-	-	2
18	O159:H8	-	-	-	-	-	-	2 ⁺	-	2

Tab. 8.8: STEC-Serovaren (O:H) in Tierkotproben aus Südbayern
09/2004 bis 12/2011

Lauf. Nr.	Serovar	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Anzahl gesamt
19	O177:H-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
20	O178:H19	-	-	-	-	2	-	-	-	2
21	O22:H16	2	-	-	-	-	-	-	-	2
22	O22:H8	1	-	1	-	-	-	-	-	2
23	O26:H11	-	-	-	-	-	2 [#]	-	-	2
24	O55:H12	-	-	-	2	-	-	-	-	2
25	O6:H34	2	-	-	-	-	-	-	-	2
26	O74:H-	-	-	-	2	-	-	-	-	2
27	O75:H-	-	2	-	-	-	-	-	-	2
28	O76:H19	-	-	1	-	1	-	-	-	2
29	Ont:H21	-	-	-	-	-	-	2 ^x	-	2
30	Ont:Hnt	-	1	1	-	-	-	-	-	2
31	Orf:Hnt	-	1	-	-	1	-	-	-	2
32	O1:H10	-	-	1	-	-	-	-	-	1
33	O1:H20	-	-	-	-	-	-	-	1	1
34	O109:H25	-	-	-	-	-	1	-	-	1
35	O111:H-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
36	O116:H28	-	-	-	-	-	-	-	1	1
37	O118:H-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
38	O123:H16	-	-	-	-	-	-	1 ^x	-	1
39	O128:H2	-	1	-	-	-	-	-	-	1
40	O136:H16	-	-	1	-	-	-	-	-	1
41	O136:Hnt	-	-	-	-	1	-	-	-	1
42	O146:H21	-	-	1	-	-	-	-	-	1
43	O149:H1	-	-	-	1	-	-	-	-	1
44	O156:H4	-	-	-	-	-	-	1	-	1
45	O157:H-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
46	O157:H7	-	-	-	-	-	-	-	1	1
47	O171:H2	-	-	-	-	-	-	-	1	1
48	O171:H25	-	-	-	-	1	-	-	-	1
49	O174:H4	-	1	-	-	-	-	-	-	1
50	O175:H16	1	-	-	-	-	-	-	-	1
51	O2:H29	-	-	-	-	-	1 [#]	-	-	1
52	O2:Hnt	-	-	-	-	1	-	-	-	1
53	O28:Hnt	-	-	1	-	-	-	-	-	1
54	O55:H31	-	1	-	-	-	-	-	-	1
55	O69:H-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
56	O74:H28	-	-	-	-	-	-	-	1	1
57	O74:H39	1	-	-	-	-	-	-	-	1

Tab. 8.8: STEC-Serovaren (O:H) in Tierkotproben aus Südbayern
09/2004 bis 12/2011

Lauf. Nr.	Serovar	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Anzahl gesamt
58	O74:H42	-	-	-	-	-	1	-	-	1
59	O75:H8	-	1	-	-	-	-	-	-	1
60	O8:H19	1	-	-	-	-	-	-	-	1
61	O8:Hnt	-	-	-	-	1	-	-	-	1
62	O86:H-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
63	O88:H25	-	-	1	-	-	-	-	-	1
64	O90:Hnt	-	-	-	-	-	-	1	-	1
65	Ont:H16	-	-	-	-	-	-	1 ⁺	-	1
66	Ont:H18	-	-	-	-	1	-	-	-	1
67	Ont:H25	-	-	1	-	-	-	-	-	1
68	Ont:H32	-	-	-	-	1	-	-	-	1
69	Orf:H10	-	-	-	-	1	-	-	-	1
70	Orf:H16	-	-	-	-	-	-	-	1	1
71	Orf:H2	-	-	-	-	-	-	-	1	1
72	Orf:H25	-	-	-	-	-	-	-	1	1
73	Orf:H29	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Gesamtergebnis		20	21	18	17	26	5	10	19	136

[#] Zwei Isolate aus der Kotprobe eines Rindes (LGL-Nummer: 09-0017485-003)

^x Zwei Isolate aus der Kotprobe eines Kalbes (LGL-Nummer: 10-0047333-001)

⁺ Zwei Isolate aus der Kotprobe eines Kalbes (LGL-Nummer: 10-0047410-001)

Tab. 8.9: Potenzielle HUSEC-Stämme aus humanen Isolaten 2009 bis 2011					
		Anzahl der potenziellen HUSEC-Stämme			
HUSEC	Serovar	2009	2010	2011	Gesamt- anzahl
HUSEC041	O104:H4	-	-	47	47
HUSEC013	O26:H11	6	7	13	26
HUSEC022	O145:H-	2	1	8	11
HUSEC003	O157:H7	2	6	2	10
HUSEC018, 020	O26:H11	1	3	6	10
HUSEC004, 006	O157:H-	3	3	-	6
HUSEC031	Orf:H-	-	2	3	5
HUSEC025	O55:Hnt	-	-	3	3
HUSEC035	O121:H19	-	-	2	2
HUSEC005	O55:H7	-	-	1	1
HUSEC034	O91:H21	-	-	1	1
HUSEC040	O174:H21	-	1	-	1
HUSEC014	O26:H-	-	1	-	1
HUSEC019	Orf:H11	-	1	-	1
Gesamtanzahl		14	25	86	125

Tab. 8.10a: Inklusivität O26

	Jahr	LGL-Nummer	Serovar	Probenmaterial	Pathovar	Virulenzgene			
						stx1	stx2	eae	EhlyA
1	2004	S 13771	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
2	2004	S 15897	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
3	2004	S 13938	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
4	2004	S 9463	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
5	2004	S 14178	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
6	2005	S 24072	O26:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
7	2005	18022	O26:H11	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
8	2005	S 4998-4	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
9	2005	S 5482-3	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
10	2005	S 5483-3	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
11	2005	S 3745	O26:H11	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
12	2005	S 7880	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
13	2005	S 8918-Stx 1	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
14	2005	S 8516	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
15	2005	S 11748	O26:H11	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
16	2005	S 12254	O26:H-	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
17	2005	S 12547	O26:H11	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
18	2006	S 3146-5	O26:H11	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
19	2006	S 3146-1	O26:H11	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
20	2006	S 3148	O26:H11	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
21	2006	5393	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
22	2006	9254	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
23	2006	S 10167	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
24	2006	S 10792	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
25	2006	S 12179	O26:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
26	2006	S 11395A	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
27	2006	S 15917	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
28	2007	1868	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
29	2007	4821	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
30	2007	4820 A3	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
31	2007	4823	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
32	2007	32628	O26:H11	Stuhl	EHEC	-	+	+	-
33	2007	32626	O26:H11	Stuhl	EHEC	-	+	+	-
34	2007	36680	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
35	2007	36711	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
36	2007	34357	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
37	2007	32627	O26:H11	Stuhl	EHEC	-	+	+	-
38	2007	37379	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
39	2007	37400	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
40	2007	49018	O26:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
41	2007	M 49-1	O26:H-	LM (Milch)	EPEC	-	-	+	+
42	2008	75212	O26:H11	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
43	2008	80162	O26:H11	Stuhl	EHEC	-	+	+	+

Tab. 8.10a: Inklusivität O26

	Jahr	LGL-Nummer	Serovar	Probenmaterial	Pathovar	Virulenzgene			
						stx1	stx2	eae	EhlyA
44	2008	80176	O26:H11	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
45	2008	10820	O26:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
46	2008	7392	O26:H11	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
47	2008	LM 14957	O26:H11	LM (W. m. Kn. ¹)	STEC	-	+	+	+
48	2008	M 49-2	O26:H-	LM (Milch)	EPEC	-	-	+	+
49	2009	Vet. 17485-004	O26:H11	Kot (Rind)	STEC	+	-	+	+
50	2009	Vet. 17485-003	O26:H11	Kot (Rind)	STEC	+	-	+	+

¹ Wildschwein mit Knochen

Tab. 8.10b: Inklusivität O103

	Jahr	LGL-Nummer	Serovar	Probenmaterial	Pathovar	Virulenzgene			
						stx1	stx2	eae	EhlyA
1	2004	S 16274-1	O103:H11	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
2	2004	S 23661	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
3	2004	S 24538	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
4	2004	WA (TW) 9453	O103:H2	Trinkwasser	STEC	+	-	+	+
5	2005	S 936	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
6	2005	S 2844	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
7	2005	S 2845	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
8	2005	S 5354-4	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
9	2005	S 3703	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
10	2005	S 6659	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
11	2005	S 10532	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
12	2005	S 10891	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
13	2005	S 10080	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	-
14	2005	S 11435	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
15	2005	S 11436	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
16	2005	S 4730	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
17	2005	WA (TW) 10971	O103:H25	Trinkwasser	STEC	+	-	+	+
18	2006	S 2979	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
19	2006	S 10795	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
20	2007	60437	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
21	2007	1781	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
22	2007	4355 B	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
23	2007	S 5420	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
24	2007	32999	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
25	2007	53416	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
26	2007	1345	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
27	2008	9568	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	-	+
28	2008	10039	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
29	2008	10037	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
30	2008	36607	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+

Tab. 8.10b: Inklusivität O103

	Jahr	LGL-Nummer	Serovar	Probenmaterial	Pathovar	Virulenzgene			
						stx1	stx2	eae	EhlyA
31	2008	40306	O103:H2	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
32	2008	42077	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
33	2008	50983	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
34	2008	62666	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
35	2008	58335	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
36	2008	69176	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
37	2008	69171	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
38	2008	67497	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
39	2009	46174	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
40	2009	61633	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
41	2009	61635	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
42	2009	67825	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
43	2009	71169	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
44	2009	90559	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
45	2010	59601	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
46	2010	85536-003	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
47	2010	88173	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
48	2010	91997	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
49	2010	91999	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
50	2010	136008	O103:H2	Stuhl	EHEC	+	-	+	+

Tab. 8.10c: Inklusivität O111

	Jahr	LGL-Nummer	Serovar	Probenmaterial	Pathovar	Virulenzgene			
						stx1	stx2	eae	EhlyA
1	2004	S 13919	O111:H-	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
2	2005	S 1238	O111:H-	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
3	2005	S 6390/1-1	O111:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
4	2005	S 6390-2	O111:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
5	2005	S 6392A-2	O111:H-	Stuhl	EHEC	+	-	-	+
6	2005	S 6312/1-1	O111:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
7	2005	S 9801	O111:H-	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
8	2005	S 9802	O111:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
9	2005	180a-Z-7811-1	O111:H-	Kot (Rind)	STEC	+	-	+	+
10	2006	6030	O111:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
11	2006	S 9991	O111:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
12	2007	56474	O111:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
13	2007	53086	O111:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
14	2007	S 5416	O111:H8	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
15	2007	33663	O111:H-	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
16	2007	33664	O111:H-	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
17	2007	25	O111:H-	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
18	2007	1524	O111:H-	Stuhl	EHEC	+	-	+	+

Tab. 8.10c: Inklusivität O111

	Jahr	LGL-Nummer	Serovar	Probenmaterial	Pathovar	Virulenzgene			
						stx1	stx2	eae	EhlyA
19	2008	50082	O111:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
20	2008	52176	O111:H-	Stuhl	EHEC	+	+	-	+
21	2009	51992	O111:H-	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
22	2010	110396	O111:H-	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
23	2010	16653	O111:H-	Stuhl	EHEC	-	+	-	+
24	2011	82019	O111:H-	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
25	2011	81279	O111:H-	Stuhl	EHEC	+	-	+	+

Tab. 8.10d: Inklusivität O145

	Jahr	LGL-Nummer	Serovar	Probenmaterial	Pathovar	Virulenzgene			
						stx1	stx2	eae	EhlyA
1	2004	S 11910	O145:Hnt	Stuhl	EHEC	+	-	-	-
2	2004	S 15562	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	-	-
3	2004	S 21150	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
4	2005	S 25381	O145:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
5	2005	S 2148	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
6	2005	S 2150	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
7	2005	S 2147	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
8	2005	S 13210	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
9	2005	S 6507-1	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	-
10	2005	S 6508-1	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
11	2005	S 6511/1-1	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
12	2005	S 7811	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
13	2005	S 11280	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
14	2005	S 10254	O145:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
15	2005	180a.Z. 669-2	O145:H-	Kot (Katze)	STEC	-	+	+	+
16	2005	180a.Z. 3746	O145:H-	Kot (Katze)	STEC	+	+	+	+
17	2006	3684	O145:H-	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
18	2006	S 3361	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
19	2006	5138	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
20	2006	5137B	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
21	2006	S 10809	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
22	2006	S 10965	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
23	2006	7193	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
24	2006	S 10371	O145:H-	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
25	2006	S 10621	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
26	2006	S 10373	O145:H-	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
27	2007	43086	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
28	2007	40253	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
29	2007	45903	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
30	2007	41274-029	O145:H-	Kot (Rind)	STEC	+	+	+	+

Tab. 8.10d: Inklusivität O145

	Jahr	LGL-Nummer	Serovar	Probenmaterial	Pathovar	Virulenzgene			
						stx1	stx2	eae	EhlyA
31	2007	41274-012	O145:H-	Kot (Rind)	STEC	-	+	+	+
32	2007	41274-030	O145:H-	Kot (Rind)	STEC	-	+	-	-
33	2007	41274-015	O145:H-	Kot (Rind)	STEC	-	+	-	-
34	2008	185	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
35	2008	37158-003	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
36	2008	36263	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
37	2008	47604	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
38	2008	53107	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
39	2009	9625	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
40	2009	9622	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
41	2009	39073 eae	O145:H-	Stuhl	EPEC	-	-	+	k. A.
42	2010	107670	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
43	2011	156810	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
44	2011	94156-003-5	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
45	2011	94156-004-2	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
46	2011	94150-001-4	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
47	2011	93056-5	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
48	2011	93055-3	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
49	2011	71976	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
50	2011	72535	O145:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+

Tab. 8.10e: Inklusivität O157

	Jahr	LGL-Nummer	Serovar	Probenmaterial	Pathovar	Virulenzgene			
						stx1	stx2	eae	EhlyA
1	2004	S 14796	O157:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
2	2004	S 15561	O157:H7	Stuhl	EHEC	-	+	-	+
3	2004	S 14083	O157:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
4	2004	S 17512	O157:H7	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
5	2005	S 1931	O157:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
6	2005	S 1932	O157:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
7	2005	15981	O157:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
8	2005	14271	O157:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
9	2005	17655-4	O157:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
10	2005	S 17656	O157:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
11	2006	S 2556	O157:H7	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
12	2006	6595	O157:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
13	2006	6597	O157:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
14	2005	S 7542	O157:H7	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
15	2005	S 8164	O157:H7	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
16	2005	S 11478	O157:H7	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
17	2006	12364	O157:H7	Stuhl	EHEC	-	+	+	+

Tab. 8.10e: Inklusivität O157

	Jahr	LGL-Nummer	Serovar	Probenmaterial	Pathovar	Virulenzgene			
						stx1	stx2	eae	EhlyA
18	2006	12026	O157:H7	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
19	2007	56897	O157:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
20	2007	60044	O157:H7	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
21	2007	51714	O157:H7	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
22	2008	36910	O157:H7	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
23	2008	37414	O157:H7	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
24	2008	34731	O157:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
25	2008	23908	O157:H7	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
26	2008	23909	O157:H7	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
27	2008	34523	O157:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
28	2008	19871	O157:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
29	2008	19877	O157:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
30	2008	37408	O157:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
31	2007	4131	O157:H-	Stuhl	EHEC	+	-	+	+
32	2007	5246	O157:H7	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
33	2007	33987	O157:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	-
34	2007	34484	O157:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
35	2007	39729	O157:H7	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
36	2007	43407	O157:H7	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
37	2007	46815	O157:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
38	2007	46814	O157:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
39	2007	46816	O157:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
40	2007	49991	O157:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
41	2007	49555	O157:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
42	2007	60305	O157:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
43	2008	46796-002	O157:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
44	2008	48897	O157:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
45	2008	51811	O157:H7	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
46	2008	65800	O157:H-	Stuhl	EHEC	+	+	+	+
47	2009	40092	O157:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
48	2009	41602	O157:H7	Stuhl	EHEC	-	+	+	+
49	2005	G 505-2	O157:H-	LM	STEC	-	+	-	-
50	2011	Vet. 9399-002	O157:H7	Kot (Mastrind)	STEC	-	+	+	+

Tab. 8.11: Exklusivität *E. coli* – Stämme anderer Serogruppen

	O-Antigen	Jahr	LGL-Nummer	Serovar	Probenmaterial	Pathovar	Virulenzgene				Beschreibung
							stx1	stx2	eae	EhlyA	
1	O1	2008	10820	O1:H-	Stuhl	EHEC	-	+	-	-	
2	O2	2005	S 334	O2:H-	Stuhl	EHEC	-	+	-	+	
3	O3	2009	1903 eae	O3:H8	Stuhl	EPEC	-	-	+	k. A.	
4	O4	2009	40482 eae	O4:H16	Stuhl	EPEC	-	-	+	k. A.	
5	O5	2007	64561	O5:H-	Stuhl	EHEC	+	+	-	+	
6	O6	2010	140683	O6:H1	Stuhl	EHEC	-	+	+	-	
7	O8	2005	3769	O8:H19	Kot	STEC	-	+	-	-	Hund
8	O10	k. A.	13a	O10:H2	LM	STEC	-	-	+	-	Schlachtkörper Rind
9	O13	2004	S 13935	O13:H4	Stuhl	EHEC	+	-	-	-	
10	O15	2005	WA 390	O15:H8	Wasser	STEC	-	+	-	+	Oberflächengewässer
11	O18	2007	1009	O18:H31	Stuhl	EHEC	-	+	-	+	
12	O20	2007	2627	O20:H30	Stuhl	EHEC	+	-	-	-	
13	O21	2008	23910	O21:H12	Stuhl	EHEC	-	+	-	-	
14	O22	2007	23	O22:H-	Stuhl	EHEC	+	-	-	-	
15	O23	2005	S 6859-1	O23:H15	Stuhl	EHEC	+	-	-	+	
16	O25	2008	55496 eae	O25:H2	Stuhl	EPEC	-	-	+	k. A.	
17	O28	2006	12362	O28:Hnt	Stuhl	EHEC	-	+	-	-	
18	O32	2009	LM 9572	O32:H40	LM	STEC	+	-	-	-	Hackfleisch, Lamm/Rind
19	O33	k. A.	LM 5151	O33:H21	LM	STEC	-	-	+	-	
20	O39	2008	54611 eae	O39:Hnt	Stuhl	EPEC	-	-	+	k. A.	

Tab. 8.11: Exklusivität *E. coli* – Stämme anderer Serogruppen

	O-Antigen	Jahr	LGL-Nummer	Serovar	Probenmaterial	Pathovar	Virulenzgene				Beschreibung
							stx1	stx2	eae	EhlyA	
21	O40	2009	Vet. 80046-005	O40:H19	Darm	STEC	+	-	-	-	Mastkalb
22	O43	2011	23331	O43:H2	Stuhl	EHEC	-	+	-	-	
23	O45	k. A.	LM 13540	O45:H-	LM	EPEC	-	-	+	-	
24	O49	2008	54488 eae	O49:H-	Stuhl	EPEC	-	-	+	k. A.	
25	O51	2005	S 9667-B	O51:H14	Stuhl	EHEC	+	-	-	-	
26	O55	2009	86921	O55:H31	Stuhl	EHEC	+	-	-	-	
27	O60	k. A.	WA 2780	O60:H-	Wasser	EPEC	-	-	+	-	
28	O64	2009	49258 LT+	O64:H21	Stuhl	ETEC	-	-	+	-	
29	O69	2008	39150 eae	O69:H-	Stuhl	EPEC	-	-	+	k. A.	
30	O74	2006	12042	O74:H-	Stuhl	EHEC	-	+	-	-	
31	O75	2005	15467-5	O75:H55	Stuhl	EHEC	+	-	-	-	
32	O76	2007	64562	O76:H19	Stuhl	EHEC	+	-	-	+	
33	O77	2005	S 4291	O77:H41	Stuhl	EHEC	+	-	-	+	
34	O78	2008	58875	O78:H-	Stuhl	EHEC	+	-	-	+	
35	O79	2010	92430	O79:H14	Stuhl	EHEC	+	-	-	-	
36	O80	2008	43653	O80:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+	
37	O84	2010	97271	O84:H-	Stuhl	EHEC	+	-	+	+	
38	O86	2009	Vet. 80046-002	O86:H-	Darm	STEC	+	-	-	-	Mastkalb
39	O88	2008	60153 eae	O88:H8	Stuhl	EPEC	-	-	+	k. A.	
40	O90	2009	66124 eae	O90:H45	Stuhl	EPEC	-	-	+	k. A.	
41	O91	2011	71966	O91:H-	Stuhl	EHEC	+	+	-	+	

Tab. 8.11: Exklusivität *E. coli* – Stämme anderer Serogruppen

	O-Antigen	Jahr	LGL-Nummer	Serovar	Probenmaterial	Pathovar	Virulenzgene				Beschreibung
							stx1	stx2	eae	EhlyA	
42	O92	2009	34570	O92:Hnt	Stuhl	EHEC	+	+	-	+	
43	O98	2008	41310 eae	O98:H-	Stuhl	EPEC	-	-	+	k. A.	
44	O100	2007	16966	O100:H-	Stuhl	EHEC	-	+	-	-	
45	O104	2011	71287	O104:H4	Stuhl	EHEC	-	+	-	-	
46	O105	2009	71007 eae	O105:H7	Stuhl	EPEC	-	-	+	-	
47	O106	2005	S 7409-2	O106:H-	Stuhl	EHEC	+	-	-	+	
48	O108	2010	43283 eae	O108:Hnt	Stuhl	EPEC	-	-	+	k. A.	
49	O109	2009	Vet. 67518	O109:H25	Kot	STEC	-	+	+	+	Rind
50	O110	2007	LM 27553 (stx2)	O110:H31	LM	STEC	-	+	-	+	Rehschulter
51	O112	2006	S 13348	O112:H-	Stuhl	EHEC	+	-	-	-	
52	O113	2006	S 1122	O113:H-	Stuhl	EHEC	+	+	-	+	
53	O114	2009	3409 eae	O114:H49	Stuhl	EPEC	-	-	+	k. A.	
54	O115	2005	S 6436-2	O115:H-	Stuhl	EHEC	+	-	-	+	
55	O116	2007	39979	O116:H-	Stuhl	EHEC	-	+	-	-	
56	O117	2008	5734	O117:H4	Stuhl	EHEC	-	+	-	-	
57	O118	2004	S 13473	O118:H16	Stuhl	EHEC	+	-	+	+	
58	O119	2010	94707	O119:H21	Stuhl	EHEC	-	-	+	-	
59	O121	2010	103325	O121:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+	
60	O123	2010	Vet. 47333 stx1	O123:H16	Kot	STEC	+	-	-	-	Mastkalb
61	O125	2011	77071	O125:H28	Trinkwasser	STEC	+	-	-	-	
62	O127	2007	78111-004	O127:Hnt	Stuhl	EHEC	-	+	+	-	

Tab. 8.11: Exklusivität *E. coli* – Stämme anderer Serogruppen

	O-Antigen	Jahr	LGL-Nummer	Serovar	Probenmaterial	Pathovar	Virulenzgene				Beschreibung
							stx1	stx2	eae	EhlyA	
63	O128	2010	150701	O128:H-	Stuhl	EHEC	+	-	-	-	
64	O130	2005	S 463	O130:H-	Stuhl	EHEC	-	+	-	-	
65	O131	2009	69633 eae	O131:H6	Stuhl	EPEC	-	-	+	k. A.	
66	O132	2009	68151 eae	O132:H34	Stuhl	EPEC	-	-	+	k. A.	
67	O136	2008	36625	O136:H16	Stuhl	EHEC	+	-	+	-	
68	O138	2005	S 1225	O138:H8	Stuhl	EHEC	-	+	-	-	
69	O139	2007	4476/07	O139:H14	Stuhl	EPEC	-	-	+	-	
70	O140	2010	154540	O140:H-	Stuhl	EHEC	+	-	-	-	
71	O141	2008	LM 20046	O141:H4	LM	STEC	-	+	-	-	Hirschgulasch
72	O142	2008	39153 eae	O142:H34	Stuhl	EPEC	-	-	+	k. A.	
73	O143	2006	S 2565-3	O143:H4	Stuhl	EHEC	-	+	-	-	
74	O146	2010	130867	O146:H21	Stuhl	EHEC	+	-	-	+	
75	O147	2006	S 12585	O147:H21	Stuhl	EHEC	-	+	-	+	
76	O149	2008	33108 EPEC	O149:H-	Stuhl	EPEC	-	-	+	k. A.	
77	O150	2011	39866	O150:H-	Stuhl	EHEC	-	+	-	+	
78	O153	2009	69638 eae	O153:H21	Stuhl	EPEC	-	-	+	k. A.	
79	O154	2005	S 9504	O154:H31	Stuhl	EHEC	+	-	-	-	
80	O156	2007	59070	O156:H25	Stuhl	EHEC	-	+	+	+	
81	O159	2010	Vet. 35238	O159:H8	Kot	STEC	-	+	-	-	Kalb
82	O160	2009	68465 eae	O160:H19	Stuhl	EPEC	-	-	+	k. A.	
83	O165	2004	WA (TW) 7708 I/1	O165:H-	Wasser	STEC	-	+	-	-	Kläranlage, Zulauf

Tab. 8.11: Exklusivität *E. coli* – Stämme anderer Serogruppen

	O-Antigen	Jahr	LGL-Nummer	Serovar	Probenmaterial	Pathovar	Virulenzgene				Beschreibung
							stx1	stx2	eae	EhlyA	
84	O166	2007	3	O166:H15	Kot	EPEC	-	-	+	-	Rind
85	O167	2010	73106 eae	O167:H4	Stuhl	EPEC	-	-	+	k. A.	
86	O168	2008	46564	O168:H28	Stuhl	EHEC	+	-	-	-	
87	O170	2010	41804 eae	O170:H-	Stuhl	EPEC	-	-	+	k. A.	
88	O171	2006	S 2740	O171:H25	Stuhl	EHEC	-	+	+	-	
89	O174	2009	13264	O174:H2	Stuhl	EHEC	+	+	-	+	
90	O175	2005	16256	O175:H4	Stuhl	EHEC	-	+	-	+	
91	O176	2005	WA 4763	O176:H-	Wasser	STEC	+	-	-	-	Oberflächengewässer
92	O177	2005	S 12909	O177:H-	Stuhl	EHEC	-	+	+	+	
93	O178	2010	166046	O178:H-	Stuhl	EHEC	+	+	-	+	
94	O179	2009	81625	O179:H8	Stuhl	EHEC	-	+	-	+	
95	O181	2008	57802	O181:H-	Stuhl	EHEC	+	+	-	+	

Tab. 8.12: Untersuchung von Mischkulturen aus humanen Stuhlproben mit negativem *stx*-Gen-Nachweis mittels EcS-PCR

	Jahr	LGL- Nummer	Ergebnis <i>stx</i> -PCR (<i>stx1</i> , <i>stx2</i>)	Ergebnis Serogruppen-PCR (Pentaplex)	C _t - Wert
1	2011	129541	negativ	negativ	-
2	2011	129543	negativ	negativ	-
3	2011	129544	negativ	<i>ihp1</i> _{O145}	34
4	2011	129545	negativ	negativ	-
5	2011	129548	negativ	negativ	-
6	2011	129549	negativ	negativ	-
7	2011	129561	negativ	negativ	-
8	2011	129868	negativ	negativ	-
9	2011	129869	negativ	negativ	-
10	2011	129870	negativ	negativ	-
11	2011	129873	negativ	negativ	-
12	2011	129876	negativ	negativ	-
13	2011	129884	negativ	negativ	-
14	2011	130194	negativ	negativ	-
15	2011	129942	negativ	negativ	-
16	2011	130511	negativ	negativ	-
17	2011	130514	negativ	negativ	-
18	2011	130543-001	negativ	negativ	-
19	2011	130534-002	negativ	negativ	-
20	2011	130534-004	negativ	negativ	-
21	2011	130534-005	negativ	negativ	-
22	2011	130538	negativ	negativ	-
23	2011	130539	negativ	negativ	-
24	2011	130540	negativ	negativ	-
25	2011	130543	negativ	negativ	-
26	2011	130557	negativ	negativ	-
27	2011	130558	negativ	negativ	-
28	2011	130926	negativ	negativ	-
29	2011	132202	negativ	negativ	-
30	2011	132235	negativ	negativ	-
31	2011	132673	negativ	<i>ihp1</i> _{O145}	20
32	2011	132674	negativ	negativ	-
33	2011	132678	negativ	negativ	-
34	2011	132679	negativ	negativ	-
35	2011	132680	negativ	negativ	-
36	2011	132681	negativ	negativ	-
37	2011	132729	negativ	negativ	-
38	2011	132730	negativ	negativ	-
39	2011	134467	negativ	negativ	-
40	2011	134470	negativ	negativ	-
41	2011	134472	negativ	negativ	-

Tab. 8.12: Untersuchung von Mischkulturen aus humanen Stuhlproben mit negativem *stx*-Gen-Nachweis

	Jahr	LGL- Nummer	Ergebnis <i>stx</i> -PCR (<i>stx1</i> , <i>stx2</i>)	Ergebnis Serogruppen-PCR (Pentaplex)	C _t -Wert
42	2011	134473	negativ	negativ	-
43	2011	134474	negativ	negativ	-
44	2011	135040	negativ	negativ	-
45	2011	135041	negativ	negativ	-
46	2011	135042	negativ	negativ	-
47	2011	134516	negativ	negativ	-
48	2011	135825	negativ	negativ	-
49	2011	134472	negativ	negativ	-
50	2011	135827	negativ	negativ	-
51	2011	135828	negativ	negativ	-
52	2011	135834-001	negativ	negativ	-
53	2011	135834-002	negativ	negativ	-
54	2011	135836	negativ	negativ	-
55	2011	135837	negativ	negativ	-
56	2011	135838	negativ	negativ	-
57	2011	135839	negativ	negativ	-
58	2011	136000-001	negativ	negativ	-
59	2011	136000-002	negativ	negativ	-
60	2011	136000-003	negativ	negativ	-
61	2011	136000-004	negativ	negativ	-
62	2011	136000-005	negativ	negativ	-
63	2011	136000-006	negativ	negativ	-
64	2011	136000-007	negativ	negativ	-
65	2011	137348	negativ	negativ	-
66	2011	137342-002	negativ	negativ	-
67	2011	137002-002	negativ	negativ	-
68	2011	137002-001	negativ	negativ	-
69	2011	136876	negativ	negativ	-
70	2011	136873	negativ	negativ	-
71	2011	136872	negativ	negativ	-
72	2011	136871	negativ	negativ	-
73	2011	136676	negativ	negativ	-
74	2011	136667-016	negativ	negativ	-
75	2011	136667-014	negativ	negativ	-
76	2011	136667-013	negativ	negativ	-
77	2011	136667-011	negativ	negativ	-
78	2011	136667-012	negativ	negativ	-
79	2011	136667-010	negativ	negativ	-
80	2011	136667-006	negativ	negativ	-
81	2011	136667-005	negativ	negativ	-
82	2011	136667-004	negativ	negativ	-

Tab. 8.12: Untersuchung von Mischkulturen aus humanen Stuhlproben mit negativem *stx*-Gen-Nachweis

	Jahr	LGL- Nummer	Ergebnis <i>stx</i> -PCR (<i>stx1</i> , <i>stx2</i>)	Ergebnis Serogruppen-PCR (Pentaplex)	C _t -Wert
83	2011	136667-003	negativ	negativ	-
84	2011	136300-007	negativ	negativ	-
85	2011	136300-008	negativ	negativ	-
86	2011	137355	negativ	negativ	-
87	2011	137354	negativ	negativ	-
88	2011	136304	negativ	negativ	-
89	2011	136300-006	negativ	negativ	-
90	2011	136300-005	negativ	negativ	-
91	2011	136300-004	negativ	negativ	-
92	2011	136300-003	negativ	negativ	-
93	2011	136300-001	negativ	negativ	-
94	2011	136298-002	negativ	negativ	-
95	2011	136298-001	negativ	<i>ihp1</i> _{O145}	24
96	2011	136222	negativ	negativ	-
97	2011	136221	negativ	negativ	-
98	2011	136219	negativ	<i>rfbE</i> _{O157}	30
99	2011	136218	negativ	<i>rfbE</i> _{O157}	36
100	2011	136006	negativ	negativ	-

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 2.1	<i>E. coli</i> -Antigene modifiziert nach QUINN et al (2011)	4
Abb. 2.2	LPS von <i>E. coli</i> - modifiziert nach SILIPO and MOLINARO (2011)	5
Abb. 2.3	Aufbau des Shigatoxins modifiziert nach SANDVIG et al (2010) mit einer A- und fünf B-Untereinheiten	11
Abb. 2.4	Einfluss verschiedener Faktoren auf die Humanvirulenz von STEC modifiziert nach FULLER et al (2011)	13
Abb. 2.5	STEC-Kolonisation im menschlichen Darm modifiziert nach FARFAN und TORRES (2011)	14
Abb. 2.6	Mögliche Entstehung der EAHEC modifiziert nach BRZUSZKIEWICZ et al. (2011)	24
Abb. 2.7	Elektronenmikroskopische Aufnahme nach SALDAÑA et al (2011)	26
Abb. 3.1	Untersuchungsschema STEC / EHEC	34
Abb. 3.2	Spektrophotometrische Messung am Beispiel der extrahierten DNA des <i>E. coli</i> O157-Referenzstammes ($c_{DNA} = 59 \text{ ng}/\mu\text{l}$)	38
Abb. 3.3	Prinzip Hydrolysesonde I	41
Abb. 3.4	Prinzip Hydrolysesonde II	41
Abb. 3.5	Verdünnungsreihe O103-Singleplex PCR-System	46
Abb. 4.1	Probenaufkommen STEC-Diagnostik im LGL, Oberschleißheim (Anzahl 2009 bis 2011)	49
Abb. 4.2	Verteilung der <i>stx</i> -Gene in <i>stx</i> -positiven, humanen Mischkulturen (Erstfälle 2009 bis 2011)	50
Abb. 4.3	Verteilung der Virulenzgene humaner EHEC-Isolate	51
Abb. 4.4	Lokalisation und Anzahl der bayerischen O104:H4-Fälle ($n = 47$)	52
Abb. 4.5	Altersverteilung der EHEC-Infizierten mit <i>stx</i> -positiven Stuhlproben (MK)	53
Abb. 4.6	Altersverteilung der EHEC O104:H4-infizierten Patienten in Bayern 2011 ($n = 47$)	54
Abb. 4.7	Darstellung der <i>stx</i> -positiven Lebensmittelproben (MK; $n = 59$) 2009 bis 2011 und der Aufteilung des Probenmaterials	56
Abb. 4.8	Darstellung der untersuchten Tierkotproben 2009 bis 2011 ($n = 240$), des <i>stx</i> -positiven Probenanteils ($n = 161$; 67,1 %) und seiner tierartlichen Verteilung	59
Abb. 4.9	Vergleichende Darstellung der Serovarenverteilung bei EHEC-Fällen in den Jahren 2004 bis 2011 sowie 2009 bis 2011	61
Abb. 4.10a	Singleplex PCR-System: O145 (Effizienz = 103,7 %, $R^2 = 0,997$)	68
Abb. 4.10b	Pentaplex PCR-System: O145 (Effizienz = 101,2 %, $R^2 = 0,993$)	68

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1	Weitere potenzielle Pathogenitätsfaktoren von STEC / EHEC, modifiziert und ergänzt nach KAPER et al (2004), MELTON-CELSA et al (2012) und WONG et al (2011)	16
Tab. 3.1	STEC-Referenzstämme der PCR-Etablierung	35
Tab. 3.2	Temperaturprofil der EcS-PCR	40
Tab. 3.3	Sequenzen der Primer und Sonden der Real-Time PCR zum Nachweis der <i>E. coli</i> -Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157	42
Tab. 3.4	Reagenzien der Singleplex Real-Time PCR (O26)	43
Tab. 3.5	Reagenzien für Pentaplex Real-Time PCR	44
Tab. 3.6	Dezimale Verdünnungsreihe	46
Tab. 4.1	Verteilung der EHEC-Erstfälle nach Geschlecht der Patienten in % (Fallzahl)	55
Tab. 4.2	Lebensmittelproben 2009 bis 2011	58
Tab. 4.3	Schlachtkörperproben 2009 bis 2011	58
Tab. 4.4	Tierkotproben 2009 bis 2011	60
Tab. 4.5	Die 10 häufigsten EHEC-Serovaren aus humanen Isolaten 09/2004 bis 12/2011 des LGL, Oberschleißheim	62
Tab. 4.6	Falsch-negative und falsch-positive Serogruppennachweise	65
Tab. 4.7	<i>Enterobacteriaceae</i> -Stämme in der EcS-PCR	66
Tab. 4.8	PCR-Effizienzen und R ² -Werte (Mittelwert ± Standardabweichung; n = 9)	67
Tab. 4.9	Nachweisgrenzen (LOD) in Genomkopien/2 µl DNA-Lösung	67
Tab. 4.10	Ergebnisse der Präzisionsbestimmung der Singleplex und Pentaplex EcS-PCR-Systeme	70
Tab. 4.11	Serogruppen-positive und <i>stx</i> -negative humane Stuhlproben (MK)	70
Tab. 8.1	Farbstoffe und Quencher	97
Tab. 8.2	Verteilung der EHEC-Erstfälle 2009 bis 2011	98
Tab. 8.3	Verteilung der Virulenzgene humaner Probenisolate in den Jahren 2009 bis 2011	98
Tab. 8.4	EHEC-Serovaren (O:H) aus Bayern von 09/2004 bis 12/2011	99
Tab. 8.5	STEC-Serovaren (O:H) aus Lebensmitteln nicht tierischer Herkunft (Südbayern, 09/2004 bis 12/2011)	104
Tab. 8.6	STEC-Serovaren (O:H) aus Lebensmitteln tierischer Herkunft (Südbayern, 09/2004 bis 12/2011)	104
Tab. 8.7	STEC-Serovaren (O:H) in Schlachtkörperproben aus Südbayern 09/2004 bis 12/2011	106
Tab. 8.8	STEC-Serovaren (O:H) in Tierkotproben aus Südbayern 09/2004 bis 12/2011	106
Tab. 8.9	Potenzielle HUSEC-Stämme aus humanen Isolaten 2009 bis 2011	108
Tab. 8.10a	Inklusivität O26	109
Tab. 8.10b	Inklusivität O103	110
Tab. 8.10c	Inklusivität O111	111
Tab. 8.10d	Inklusivität O145	112
Tab. 8.10e	Inklusivität O157	113
Tab. 8.11	Exklusivität <i>E. coli</i> – Stämme anderer Serogruppen	115
Tab. 8.12	Untersuchung von Mischkulturen aus humanen Stuhlproben mit negativem <i>stx</i> -Gen-Nachweis mittels EcS-PCR	120

LITERATURVERZEICHNIS

AIZAWA, S. I. (2009). Flagella. The Desk Encyclopedia of Microbiology. M. SCHAECHTER. Kidlington, UK, Academic Press (Elsevier). **2**: 530.

AL-ABRI, S. S., N. J. BEECHING und F. J. NYE (2005). Traveller's diarrhoea. The Lancet Infectious Diseases **5**: 349 - 360.

ALDICK, T., M. BIELASZEWSKA, B. E. UHLIN, H.-U. HUMPF, S. N. WAI und H. KARCH (2009). Vesicular stabilization and activity augmentation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* haemolysin. Molecular Microbiology **71**: 1496 - 1508.

ALDICK, T., M. BIELASZEWSKA, W. ZHANG, J. BROCKMEYER, H. SCHMIDT, A. W. FRIEDRICH, K. S. KIM, M. A. SCHMIDT und H. KARCH (2007). Hemolysin from Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O26 strains injures microvascular endothelium. Microbes and Infection **9**: 282 - 290.

BAE, W. K., Y. K. LEE, M. S. CHO, S. K. MA, S. W. KIM, N. H. KIM und K. C. CHOI (2006). A Case of Hemolytic Uremic Syndrome Caused by *Escherichia coli* O104:H4. Yonsei Medical Journal **47**: 437 - 439.

BALLMER, K., B. M. KORCZAK, P. KUHNERT, P. SLICKERS, R. EHRLICH und H. HÄCHLER (2007). Fast DNA Serotyping of *Escherichia coli* by Use of an Oligonucleotide Microarray. Journal of Clinical Microbiology **45**: 370 - 379.

BARDIAU, M., F. GRÉGOIRE, A. MUYLAERT, A. NAHAYO, J.-N. DUPREZ, J. MAINIL und A. LINDEN (2010). Enteropathogenic (EPEC), enterohaemorrhagic (EHEC) and verotoxigenic (VTEC) *Escherichia coli* in wild cervids. Journal of Applied Microbiology **109**: 2214-2222.

BAUER, M. E. und R. A. WELCH (1996). Characterization of an RTX Toxin from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infection and Immunity **64**: 167-175.

BAYLIS, C. L. (2009). Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. International Journal of Dairy Technology **62**: 293 - 307.

BENNANI, M., S. BADRI, T. BAIBAI, N. OUBRIM, M. HASSAR, N. COHEN und H. AMAROUCH (2011). First Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Shellfish and Coastal Environments of Morocco. Applied Biochemistry and Biotechnology **165**: 290 - 299.

BENTANCOR, A., M. V. RUMI, C. CARBONARI, E. GERHARDT, M. LARZÁBAL, D. A. VILTE, V. PISTONE-CREYDT, I. CHINEN, C. IBARRA, A. CATALDI und E. C. MERCADO (2012). Profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from dogs and cats and genetic relationships with isolates from cattle, meat and humans. Veterinary Microbiology **156**: 336 - 342.

BERGER, C. N., S. V. SODHA, R. K. SHAW, P. M. GRIFFIN, D. PINK, P. HAND und G. FRANKEL (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology* **12**: 2385 - 2397.

BETTELHEIM, K. A. (2007). The Non-O157 Shiga-Toxigenic (Verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; Under-Rated Pathogens. *Critical Reviews in Microbiology* **33**: 67 - 87.

BETTELHEIM, K. A. (2012). Non-O157 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *The Lancet* **12**: 12.

BETTELHEIM, K. A., A. KUZEVSKI, R. A. GILBERT, D. O. KRAUSE und C. MCSWEENEY (2005). The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. *Journal of Applied Microbiology* **98**: 699 - 709.

BEUTIN, L. (2011). Paradigmenwechsel. *labor&more* **4.11**: 22 - 25.

BEUTIN, L., S. JAHN und P. FACH (2009). Evaluation of the 'GeneDisc' real-time PCR system for detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O26, O103, O111, O145 and O157 strains according to their virulence markers and their O- and H-antigen-associated genes. *Journal of Applied Microbiology* **106**: 1122 - 1132.

BfR (2011a). Bedeutung von EHEC O104:H4 in Bockshornkleesamen, die zu anderen Lebensmitteln als Sprossen und Keimlingen weiterverarbeitet werden. Zuletzt aufgerufen am 28.02.2013 über http://www.bfr.bund.de/cm/343/bedeutung_von_ehec_o104_h4_in_bockshornkleesamen_die_zu_anderen_lebensmitteln_als_sprossen_und_keimlingen_weiterverarbeitet_werden.pdf.

BfR (2011b). Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2009. Berlin, BfR Wissenschaft.

BfR (2012a). Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2010. Berlin, BfR Wissenschaft.

BfR (2012b). Nationales Referenzlabor für *Escherichia coli* einschließlich verotoxinbildende *E. coli*. Zuletzt aufgerufen am 28.02.2013 über http://www.bfr.bund.de/de/nationales_referenzlabor_fuer_escherichia_coli_einschliesslich_verotoxinbildende_e_coli-8815.html.

BIELASZEWSKA, M., A. W. FRIEDRICH, T. ALDICK, R. SCHÜRK-BULGRIN und H. KARCH (2006). Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clinical Infectious Diseases* **43**: 1160-1167.

BIELASZEWSKA, M., R. KÖCK, A. W. FRIEDRICH, C. v. EIFF, L. B. ZIMMERHACKL, H. KARCH und A. MELLMANN (2007a). Shiga Toxin-Mediated Hemolytic Uremic Syndrome: Time to Change the Diagnostic Paradigm? *PLoS ONE* **2**: e1024.

- BIELASZEWSKA, M., B. MIDDENDORF, R. KÖCK, A. W. FRIEDRICH, A. FRUTH, H. KARCH, M. A. SCHMIDT und A. MELLMANN (2008). Shiga Toxin-Negative Attaching and Effacing *Escherichia coli*: Distinct Clinical Associations with Bacterial Phylogeny and Virulence Traits and Inferred In-Host Pathogen Evolution. *Clinical Infectious Diseases* **47**: 208 - 217.
- BIELASZEWSKA, M., R. PRAGER, R. KÖCK, A. MELLMANN, W. ZHANG, H. TSCHÄPE, P. I. TARR und H. KARCH (2007b). Shiga Toxin Gene Loss and Transfer In Vitro and In Vivo during Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 Infection in Humans. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 3144 - 3150.
- BIELASZEWSKA, M., R. PRAGER, L. VANDIVINIT, A. MÜSKEN, A. MELLMANN, N. J. HOLT, P. I. TARR, H. KARCH und W. ZHANG (2009a). Detection and Characterization of the Fimbrial *sfp* Cluster in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O165:H25/NM Isolates from Humans and Cattle. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 64 - 71.
- BIELASZEWSKA, M., F. STOEWEL, A. FRUTH, W. ZHANG, R. PRAGER, J. BROCKMEYER, A. MELLMANN, H. KARCH und A. W. FRIEDRICH (2009b). Shiga Toxin, Cytolethal Distending Toxin, and Hemolysin Repertoires in Clinical *Escherichia coli* O91 Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **47**: 2061 - 2066.
- BIPM (2006). The International System of Units (SI). Paris, Frankreich, Bureau International des Poids et Mesures/Organisation Intergouvernemental de la Convention du Mètre.
- BMSB (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - The Proteobacteria - Part B The Gammaproteobacteria*. New York, Springer.
- BOCKEMÜHL, J., H. KARCH und H. TSCHÄPE (1997). Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1996. *Bundesgesundheitsblatt* **40**: 194-197.
- BOERLIN, P., S. A. McEWEN, F. BOERLIN-PETZOLD, J. B. WILSON, R. P. JOHNSON und C. L. GYLES (1999). Associations between Virulence Factors of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Disease in Humans. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 497-503.
- BOGNER, P. N. und A. A. KILLEEN (2006). Extraction of Nucleic Acids. *Molecular Diagnostics for the Clinical Laboratorian*. W. B. COLEMAN und G. J. TSONGALIS. New Jersey, USA, Humana Press. **2**.
- BOSILEVAC, J. M. und M. KOOHMARAIE (2011). Prevalence and Characterization of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Commercial Ground Beef in the United States. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 2103 - 2112.
- BOYER, O. und P. NIAUDET (2011). Hemolytic Uremic Syndrome: New Developments in Pathogenesis and Treatment. *International Journal of Nephrology* **2011**: 908407.

- BRIGOTTI, M., P. L. TAZZARI, E. RAVANELLI, D. CARNICELLI, L. ROCCHI, V. ARFILLI, G. SCAVIA, F. MINELLI, F. RICCI, F. PAGLIALONGA, A. EDEFONTI, M. A. PROCACCINO, A. E. TOZZI und A. CAPRIOLI (2011). Clinical Relevance of Shiga Toxin Concentrations in the Blood of Patients With Hemolytic Uremic Syndrome. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **30**: 486 - 490.
- BROCKMEYER, J., T. ALDICK, J. SOLTWISCH, W. ZHANG, P. I. TARR, A. WEISS, K. DREISEWERD, J. MÜTHING, M. BIELASZEWSKA und H. KARCH (2011). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* haemolysin is cleaved and inactivated by serine protease EspPα. *Environmental Microbiology* **13**: 1327 - 1341.
- BRZUSZKIEWICZ, E., A. THÜRMER, J. SCHULDES, A. LEIMBACH, H. LIESEGANG, F.-D. MEYER, J. BOELTER, H. PETERSEN, G. GOTTSCHALK und R. DANIEL (2011). Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Archives of Microbiology* **193**: 883 - 891.
- BÜRK, C., R. DIETRICH, G. ACAR, M. MORAVEK, M. BÜLTE und E. MÄRTLBAUER (2003). Identification and Characterization of a New Variant of Shiga Toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H7 of Bovine Origin. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 2106 - 2112.
- BUGAREL, M., L. BEUTIN, A. MARTIN, A. GILL und P. FACH (2010). Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans. *International Journal of Microbiology* **142**: 318 - 329.
- BUGAREL, M., L. BEUTIN, F. SCHEUTZ, E. LOUKIADIS und P. FACH (2011). Identification of Genetic Markers for Differentiation of Shiga Toxin-Producing, Enteropathogenic and Avirulent Strains of *Escherichia coli* O26. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 2275 - 2281.
- BUSCH, U., S. HÖRMANNSDORFER, S. SCHRANNER, I. HUBER, K.-H. BOGNER und A. SING (2007). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Excretion by Child and Her Cat. *Emerging Infectious Diseases* **13**: 348 - 349.
- CASTELLANI, A. und A. J. CHALMERS (1919). *Manual of Tropical Medicine*. London, UK, Baillière, Tindall and Cox.
- CASTRO-ROSAS, J., J. F. CERNA-CORTÉS, E. MÉNDEZ-REYES, D. LOPEZ-HERNANDEZ, C. A. GÓMEZ-ALDAPA und T. ESTRADA-GARCIA (2012). Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. *International Journal of Food Microbiology* **156**: 176 - 180.
- CDC (1982). Epidemiologic Notes and Reports Isolation of *E. coli* O157:H7 from Sporadic Cases of Hemorrhagic Colitis -- United States. *MMWR* **31**: 580 - 585.
- CDC (1995). Outbreak of Acute Gastroenteritis Attributable to *Escherichia coli* Serotype O104:H21 - Helena, Montana, 1994. *MMWR Weekly* **44**: 501 - 503.

CHART, H. und T. CHEASTY (2008). Human infections with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 - 10 years of *E. coli* O157 serodiagnosis. *Journal of Medical Microbiology* **57**: 1389 - 1393.

CHASE-TOPPING, M. E., T. ROSSER, L. J. ALLISON, E. COURCIER, J. EVANS, I. J. McKENDRICK, M. C. PEARCE, I. HANDEL, A. CAPRIOLI, H. KARCH, M. F. HANSON, K. G. J. POLLOCK, M. E. LOCKING, M. E. J. WOOLHOUSE, L. MATTHEWS, J. C. LOW und D. L. GALLY (2012). Pathogenic Potential to Humans of Bovine *Escherichia coli* O26, Scotland. *Emerging Infectious Diseases* **18**: 439 - 448.

CHAURET, C. (2011). Survival and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods, beverages, soil and water. *Virulence* **2**: 593 - 601.

CHRISTIE, W. W. (2011). Lipid A and Bacterial Lipopolysaccharides - structure, occurrence and biology. Zuletzt aufgerufen am 28.02.2013 über <http://lipidlibrary.aocs.org/lipids/lipidA/index.htm>.

CLAWSON, M. L., J. E. KEEN, T. P. L. SMITH, L. M. DURSO, T. G. MCDANELD, R. E. MANDRELL, M. A. DAVIS und J. L. BONO (2009). Phylogenetic classification of *Escherichia coli* O157:H7 strains of human and bovine origin using a novel set of nucleotide polymorphisms. *Genome Biology* **10**: R56.

CLERMONT, O., M. OLIER, C. HOEDE, L. DIANCOURT, S. BRISSE, M. KEROUDEAN, J. GLODT, B. PICARD, E. OSWALD und E. DENAMUR (2011). Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infection, Genetics and Evolution* **11**: 654 - 662.

COOMBES, B. K., M. W. GILMOUR und C. D. GOODMAN (2011). The evolution of virulence in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology* **2**: Article 90.

COOMBES, B. K., M. E. WICKHAM, M. MASCARENHAS, S. GRUENHEID, B. B. FINLAY und M. A. KARMALI (2008). Molecular Analysis as an Aid To Assess the Public Health Risk of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 2153 - 2160.

CROXEN, M. und B. B. FINLAY (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews. Microbiology* **8**: 26 - 38.

DE SABLET, T., Y. BERTIN, M. VAREILLE, J.-P. GIRARDEAU, A. GARRIVIER, A. P. GOBERT und C. MARTIN (2008). Differential expression of *stx2* variants in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* belonging to seropathotypes A and C. *Microbiology* **154**: 176 - 186.

DESMARCHELIER, P. m., S. S. BILGE, N. FEGAN, L. MILLS, J. C. VARY und P. I. TARR (1998). A PCR Specific for *Escherichia coli* O157 Based on the *rfb* Locus Encoding O157 Lipopolysaccharide. *Journal of Clinical Microbiology* **36**: 1801 - 1804.

DINGES, M. (2008). Männer - Gesundheitsidioten? labor&more. Zuletzt aufgerufen am 28.02.2013 über <http://www.laborundmore.de/news/19,305018/LM-1-2008/Maenner-Gesundheitsidioten-%3F.html>.

DOBRINDT, U. (2007). *Escherichia coli* - der Klassiker seit 120 Jahren. Biospektrum **4**: 382.

ECDC (2011). European Food Safety Authority evaluates public health risk of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in seeds and sprouted seeds. Euro Surveillance **16**: pii=20025.

ECDC/EFSA (2011). ECDC/EFSA Joint Technical Report - Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* in humans, food and animals in the EU/EEA, with special reference to the German outbreak strain STEC O104. Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control.

ECODAB (2012). ECODAB - *Escherichia coli* O-antigen Database. Zuletzt aufgerufen am 28.02.2013 über <http://www.casper.org.se/ECODAB/list.php>.

EFSA (2009). Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. The EFSA Journal **223**.

EFSA (2011a). Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 outbreaks in Europe: Taking Stock. EFSA Journal **9**: 2390.

EFSA (2011b). Urgent advice on the public health risk of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in fresh vegetables. EFSA Journal **9**: 2274.

EGGERT, M. (2011). Nachweis und Charakterisierung von Shigatoxin-bildenden *Escherichia coli* in Wildwiederkäuern. München über http://edoc.ub.uni-muenchen.de/12798/1/Eggert_Marlene.pdf.

ENGLUND, h. und W. HAUTMANN (2012). Using an outbreak to study the sensitivity of the surveillance of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and other enteropathic *Escherichia coli* in Bavaria, Germany, January to October 2011. Euro Surveillance **17**: pii=20251.

ESCHERICH, T. (1885). Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. Fortschritte der Medizin **8**: 515 - 522; 547 - 555.

ESHIMA, N., O. TOKUMARU, S. HARA, K. BACAL, S. KOREMATSU, S. KARUKAYA, K. URUMA, N. OKABE und T. MATSUIISHI (2012). Age-Specific Sex-Related Differences in Infections: A Statistical Analysis of National Surveillance Data in Japan. PLoS ONE **7**: e42261.

ETHELBERG, S., K. E. P. OLSEN, F. SCHEUTZ, C. JENSEN, P. SCHIELLERUP, J. ENGBERG, A. M. PETERSEN, B. OLESEN, P. GERNER-SMIDT und K. MOLBAK (2004). Virulence Factors for Hemolytic Uremic Syndrome, Denmark. Emerging Infectious Diseases **10**: 842 - 847.

FARFAN, M. J. und A. G. TORRES (2011). Molecular Mechanisms That Mediate Colonization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains. *Infection and Immunity* **80**: 903 - 913.

FENG, P., S. D. WEAGANT und S. R. MONDAY (2001). Genetic Analysis for Virulence Factors in *Escherichia coli* O104:H21 That Was Implicated in an Outbreak of Hemorrhagic Colitis. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 24 - 28.

FERNÁNDEZ, D., K. IRINO, M. E. SANZ, N. L. PADOLA und A. E. PARMA (2010). Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from dairy cows in Argentina. *Letters in Applied Microbiology* **51**: 377 - 382.

FLI (2012a). Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) / Shiga-Toxin produzierende *E. coli* (STEC): Informationen des Friedrich-Loeffler-Instituts. Zuletzt aufgerufen am 28.02.2013 über http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/images/Presse_Forschung/110607_FLI_EHEC_Information.pdf.

FORSYTHE, S. J. (2010). *The Microbiology of Safe Food*. Chichester, UK, Wiley-Blackwell.

FRANK, C., S. KAPFHAMMER, D. WERBER, K. STARK und L. HELD (2008). Cattle Density and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infection in Germany: Increased Risk for Most but Not All Serogroups. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **8**: 635 - 643.

FRATAMICO, P. M., X. YAN, A. CAPRIOLI, G. ESPOSITO, D. S. NEEDLEMAN, T. PEPE, R. TOZZOLI, M. L. CORTESI und S. MORABITO (2011). The complete DNA sequence and analysis of the virulence plasmid and of five additional plasmids carried by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 strain H30. *International Journal of Medical Microbiology* **301**: 192 - 203.

FREMAUX, B., C. PRIGENT-COMBARET, M. L. DELIGNETTE-MULLER, B. MALLÉN, M. DOTHAL, A. GLEIZAL und C. VERNIZY-ROZAND (2008). Persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in various manure-amended soil types. *Journal of Applied Microbiology* **104**: 296 - 304.

FRIEDRICH, A. W. (2011). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4: are we prepared now? *Euro Surveillance* **16**: pii=19938.

FRIEDRICH, A. W., M. BIELASZEWSKA, W.-L. ZHANG, M. PULZ, T. KUCZIUS, A. AMMON und H. KARCH (2002). *Escherichia coli* Harboring Shiga Toxin 2 Gene Variants: Frequency and Association with Clinical Symptoms. *Journal of Infectious Diseases* **185**: 74-84.

FRIEDRICH, A. W., W. ZHANG, M. BIELASZEWSKA, A. MELLMANN, R. KÖCK, A. FRUTH, H. TSCHÄPE und H. KARCH (2007). Prevalence, Virulence Profiles, and Clinical Significance of Shiga Toxin-Negative Variants of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Infection in Humans. *Clinical Infectious Diseases* **45**: 39 - 45.

FRUTH, A. (2005). Biodiversität der O- und H-Antigene von *Escherichia coli*: serologische und molekulare Identifizierung. Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät. Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg über <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/05/05H191/t2.pdf>.

FULLER, C. A., C. A. PELLINO, M. J. FLAGLER, J. E. STRASSER und A. A. WEISS (2011). Shiga Toxin Subtypes Display Dramatic Differences in Potency. *Infection and Immunity* **79**: 1329-1337.

GALLEGOS, K. M., D. G. CONRADY, S. S. KARVE, T. S. GUNASEKERA, A. B. HERR und A. A. WEISS (2012). Shiga Toxin Binding to Glycolipids and Glycans. *PLoS ONE* **7**: e30368.

GARCÍA-SÁNCHEZ, A., S. SÁNCHEZ, R. RUBIO, G. PEREIRA, J. M. ALONSO, J. HERMOSO DE MENDOZA und J. REY (2007). Presence of Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 in a survey of wild artiodactyls. *Veterinary Microbiology* **121**: 373 - 377.

GEUE, L., S. SCHARES, B. MINTEL, F. J. CONRATHS, E. MÜLLER und R. EHRLICH (2010). Rapid Microarray-Based Genotyping of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Serotype O156:H25/H-/Hnt Isolates from Cattle and Clonal Relationship Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 5510-5519.

GILL, A. und C. O. GILL (2010). Non-O157 verotoxigenic *Escherichia coli* and beef: A Canadian perspective. *The Canadian Journal of Veterinary Research* **74**: 161 - 169.

GILMOUR, M. W., A. B. OLSON, A. K. ANDRYSIK, L.-K. NG und L. CHUI (2007). Sequence-based typing of genetic targets encoded outside of the O-antigen gene cluster is indicative of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroup lineages. *Journal of Medical Microbiology* **56**: 620 - 628.

GOLDWATER, P. N. und K. A. BETTELHEIM (2012). Treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection and hemolytic uremic syndrome (HUS). *BMC Medicine* **10**: 1741-7015/1710/1712.

GOLLER, C. C. und P. C. SEED (2010). Revisiting the *Escherichia coli* polysaccharide capsule as a virulence factor during urinary tract infection. *Virulence* **1**: 333 - 337.

GOULD, L. H. und J. G. JORDAN (2011). Postdiarrheal Hemolytic Uremic Syndrome in Persons Aged 65 and Older in Foodnet Sites, 2000 - 2006. *JAGS* **59**: 366 - 379.

GROHMANN, A. N., M. JEKEL, A. GROHMANN, R. SZEWZYK und U. SZEWZYK (2011). Wasser - Chemie, Mikrobiologie und nachhaltige Nutzung. Berlin / New York, De Gruyter.

GYLES, C. L. und J. M. FAIRBROTHER (2010). *Escherichia coli*. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. C. L. GYLES, J. F. PRESCOTT, J. G. SONGER und C. O. THOEN. Ames, USA, Wiley-Blackwell. **4**: 267 - 308.

HAURI, A. M., U. GÖTSCH, I. STROTMANN, J. KRAHN, G. BETTGE-WELLER, H. J. WESTBROCK, O. BELLINGER und H. UPHOFF (2011). Secondary transmission during the outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104 in Hesse, Germany, 2011. *Euro Surveillance* **16**: 19937.

HEDICAN, E. B., C. MEDUS, J. M. BESSER, B. A. JUNI, B. KOZIOL, C. TAYLOR und K. E. SMITH (2009). Characteristics of O157 versus Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections in Minnesota, 2000 - 2006. *Clinical Infectious Diseases* **49**: 358 - 364.

HERNANDES, R. T., W. P. ELIAS, M. A. M. VIEIRA und T. A. T. GOMES (2009). An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **297**: 137 - 149.

HOUSE, B., J. V. KUS, N. PRAYITNO, R. MAIR, L. QUE, F. CHINGUANCO, V. GANNON, D. G. CVITKOVITCH und D. B. FOSTER (2009). Acid-stress-induced changes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 virulence. *Microbiology* **155**: 2907 - 2918.

HUBER, H. C., R. KUGLER und B. LIEBL (1998). Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) - Ergebnisse einer epidemiologischen Erhebung in Bayern für den Zeitraum April 1996 bis März 1997. *Gesundheitswesen* **60**: 159-165.

IMAMOVIC, L., J. JOFRE, H. SCHMIDT, R. SERRA-MORENO und M. MUNIESA (2009). Phage-Mediated Shiga Toxin 2 Gene Transfer in Food and Water. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 1764 - 1768.

INVITROGEN (2008). Quant-iT™ PicoGreen(R) dsDNA Reagent and Kits. Zuletzt aufgerufen am 28.02.2013 über <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07581.pdf>.

IYODA, S., K. TAMURA, K. ITOH, H. IZUMIYA, N. UENO, K. NAGATA, M. TOGO, J. TERAJIMA und H. WATANABE (2000). Inducible *stx2* phages are lysogenized in the enteroaggregative and other phenotypic *Escherichia coli* O86:HNM isolated from patients. *FEMS Microbiology Letters* **191**: 7 - 10.

JACOBSEN, L., L. DURSO, T. CONWAY und K. W. NICKERSON (2009). *Escherichia coli* O157:H7 and Other *E. coli* Strains Share Physiological Properties Associated with Intestinal Colonization. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 4633 - 4635.

JENKE, C., B. A. LINDSTEDT, D. HARMSSEN, H. KARCH, L. T. BRANDAL und A. MELLMANN (2011). Comparison of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis and Multilocus Sequence Typing for Differentiation of Hemolytic-Uremic Syndrome-Associated *Escherichia coli* (HUSEC) Collection Strains. *Journal of Clinical Microbiology* **49**: 3644-3646.

JENKINS, C., J. EVANS, H. CHART, G. A. WILLSHAW und G. FRANKEL (2008). *Escherichia coli* serogroup O26 - a new look at an old adversary. *Journal of Applied Microbiology* **104**: 14 - 25.

JERSE, A. E., J. YU, B. D. TALL und J. B. KAPER (1990). A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. Proceedings of the National Academy of Science USA **87**: 7839-7843.

JOHANNES, L. und W. RÖMER (2010). Shiga toxins - from cell biology to biomedical applications. Nature Reviews. Microbiology **8**: 105 - 116.

JORIS, M. A., D. PIERARD und L. De ZUTTER (2011). Occurrence and virulence patterns of *E. coli* O26, O103, O111 and O145 in slaughter cattle. Veterinary Microbiology **151**: 418 - 421.

KAPER, J. B., J. P. NATARO und H. L. T. MOBLEY (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews. Microbiology **2**: 123 - 140.

KÄPPELI, U., H. HÄCHLER, N. GIEZENDANNER, L. BEUTIN und R. STEPHAN (2011). Human Infections with Non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*, Switzerland, 2000 - 2009. Emerging Infectious Diseases **17**: 180 - 185.

KARCH, H., A. MELLMANN und M. BIELASZEWSKA (2009). Epidemiology and pathogenesis of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **122**: 417 - 424.

KARMALI, M. A., M. MASCARENHAS, M. PETRIC, L. DUTIL, K. RAHN, K. LUDWIG, G. S. ARBUS, P. MICHEL, P. M. SHERMAN, J. WILSON, J. JOHNSON und J. B. KAPER (2003b). Age-Specific Frequencies of Antibodies to *Escherichia coli* Verocytotoxins (Shiga Toxins) 1 and 2 among Urban and Rural Populations in Southern Ontario. Journal of Infectious Diseases **188**: 1724 - 1729.

KARMALI, M. A., M. MASCARENHAS, S. SHEN, K. ZIEBELL, S. JOHNSON, R. REID-SMITH, J. ISAAC-RENTON, C. CLARK, K. RAHN und J. B. KAPER (2003a). Association of Genomic O Island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verotoxin-Producing *Escherichia coli* Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease. Journal of Clinical Microbiology **41**: 4930 - 4940.

KASPAR, C., M. E. DOYLE und J. ARCHER (2010). White Paper on Non-O157:H7 Shiga Toxin-Producing *E. coli* from Meat and Non-Meat Sources. FRI Food Safety Reviews über http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRI_Brief_NonO157STEC_4_10.pdf.

KATAOKA, Y., Y. IRIE, T. SAWADA und M. NAKAZAWA (2010). A 3-Year Epidemiological Surveillance of *Escherichia coli* O157:H7 in Dogs and Cats in Japan. Journal of Veterinary Medical Science **72**: 791 - 794.

KAUFFMANN, F. und G. VAHLNE (1945). Über die Bedeutung des serologischen Formenwechsels für die Bakteriophagenwirkung in der Coli-Gruppe. Acta Path Microbiol Scand **22**: 119 - 137.

KIRSCH, P., J. JORES und L. H. WIELER (2004). Plastizität bakterieller Genome: Pathogenitätsinseln und der Locus of Enterocyte Effacement (LEE). Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **117**: 116 - 129.

KONCZY, P., K. ZIEBELL, M. MASCARENHAS, A. CHOI, C. MICHAUD, A. M. KROPINSKI, T. S. WHITTAM, M. WICKHAM, B. FINLAY und M. A. KARMALI (2008). Genomic O Island 122, Locus for Enterocyte Effacement, and the Evolution of Virulent Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **190**: 5832 - 5840.

KOZUB-WITKOWSKI, E., G. KRAUSE, G. FRANKEL, D. KRAMER, B. APPEL und L. BEUTIN (2008). Serotypes and virutypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains from stool samples of children with diarrhoea in Germany. *Journal of Applied Microbiology* **104**: 403 - 410.

LAPAGE, S. P., P. H. A. SNEATH, E. F. LESSEL, V. B. D. SKERMAN, H. P. R. SEELIGER und W. A. CLARK (1992). International Code of Nomenclature of Bacteria. Bacteriological Code, 1990 Revision, ASM Press.

LARGE, T. M., S. T. WALK und T. S. WHITTAM (2005). Variation in Acid Resistance among Shiga Toxin-Producing Clones of Pathogenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 2493 - 2500.

LATHROP, S., K. EDGE und J. BARETA (2009). Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*, New Mexico, USA, 2004-2007. *Emerging Infectious Diseases* **15**: 1289 - 1291.

LEUNG, P. H. M., J. S. M. PEIRIS, W. W. S. NG, R. M. ROBINS-BROWNE, K. A. BETTELHEIM und W. C. YAM (2003). A Newly Discovered Verotoxin Variant, VT2g, Produced by Bovine Verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 7549-7553.

LINGWOOD, C. A., B. BINNINGTON, A. MANIS und D. R. BRANCH (2009). Globotriaosyl ceramid receptor function - Where membrane structure and pathology intersect. *FEBS Letters* **584**: 1879 - 1886.

LIU, B., Y. A. KNIREL, A. v. PEREPELOV, S. N. SENCHENKOVA, Q. WANG, P. R. REEVES und L. WANG (2008). Structure and genetics of Shigella O antigens. *FEMS Microbiological Reviews* **32**: 627 - 653.

LOOS, S., T. AHLENSTIEL, B. KRANZ, H. STAUDE, L. PAPE, C. HÄRTEL, U. VESTER, L. BUCHTALA, K. BENZ, B. HOPPE, O. BERINGER, M. KRAUSE, D. MÜLLER, M. POHL, J. LEMKE, G. HILLEBRAND, M. KREUZER, J. KÖNIG, M. WIGGER, M. KONRAD, D. HAFFNER, J. OH und M. J. KEMPER (2012). An Outbreak of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O104:H4 Hemolytic Uremic Syndrome in Germany: Presentation and Short-term Outcome in Children. *Clinical Infectious Diseases Advance Access*: 1-7.

LOWE, R. M. S., D. BAINES, L. B. SELINGER, J. E. THOMAS, T. A. McALLISTER und R. SHARMA (2009). *Escherichia coli* O157:H7 Strain Origin, Lineage, and Shiga Toxin 2 Expression Affect Colonization in Cattle. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 5074 - 5081.

LUDEWIG, M. und K. FEHLHABER (2009). Investigations on the generation time of selected gramnegative bacteria species. *Arch Lebensmittelhyg* **60**: 56 - 60.

LYNCH, M. F., R. V. TAUXE und C. W. HEDBERG (2009). The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiology and Infection* **137**: 307 - 315.

MAHAJAN, A., C. G. CURRIE, S. MACKIE, J. TREE, S. McATEER, I. McKENDRICK, T. N. McNEILLY, A. ROE, R. M. LA RAGIONE, M. J. WOODWARD, D. L. GALLY und G. E. SMITH (2009). An investigation of the expression and adhesin function of H7 flagella in the interaction of *Escherichia coli* O157:H7 with bovine intestinal epithelium. *Cellular Microbiology* **11**: 121 - 137.

MARTIN, A. und L. BEUTIN (2011). Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources. *International Journal of Food Microbiology* **146**: 99 - 104.

MAURO, S. A. und G. B. KOUDELKA (2011). Shiga Toxin: Expression, Distribution, and Its Role in the Environment. *Toxins* **3**: 608 - 625.

MELLMANN, A., M. BIELASZEWSKA, R. KÖCK, A. W. FRIEDRICH, A. FRUTH, B. MIDDENDORF, D. HARMSSEN, M. A. SCHMIDT und H. KARCH (2008a). Analysis of Collection of Hemolytic Uremic Syndrome-associated Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases* **14**: 1287 - 1290.

MELLMANN, A., D. HARMSSEN, C. A. CUMMINGS, E. B. ZENTZ, S. R. LEOPOLD, A. RICO, K. PRIOR, R. SZCZEPANOWSKI, Y. JI, W. ZHANG, S. F. McLAUGHLIN, J. K. HENKHAUS, B. LEOPOLD, M. BIELASZEWSKA, R. PRAGER, P. M. BRZOSKA, R. L. MOORE, S. GUENTHER, J. M. ROTHBERG und H. KARCH (2011). Prospective Genomic Characterization of the German Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak by Rapid Next Generation Sequencing Technology. *PLoS ONE* **6**: e22751.

MELLMANN, A., S. LU, H. KARCH, J. XU, D. HARMSSEN, M. A. SCHMIDT und M. BIELASZEWSKA (2008b). Recycling of Shiga Toxin 2 Genes in Sorbitol-Fermenting Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 67 - 72.

MELTON-CELSA, A., K. MOHAWK, L. TEEL und A. O'BRIEN (2012). Pathogenesis of Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli*. *Ricin and Shiga Toxins - Pathogenesis, Immunity, Vaccines and Therapeutics*. N. J. MANTIS. Berlin Heidelberg, Springer: 67 - 91.

MELTON-CELSA, A. R., J. F. KOKAI-KUN und A. D. O'BRIEN (2002). Activation of Shiga toxin type 2d (Stx2d) by elastase involves cleavage of the C-terminal two amino acids of the A₂ peptide in the context of the appropriate B pentamer. *Molecular Microbiology* **43**: 207-215.

MENNE, J., M. NITSCHKE, R. STINGELE, M. ABU-TAIR, J. BENEKE, J. BRAMSTEDT, J. P. BREMER, R. BRUNKHORST, V. BUSCH, R. DENGLE, G. DEUSCHL, K. FELLERMANN, H. FICKENSCHER, C. GERIGK, A. GOETTSCHE, J. GREEVE, C. HAFFER, F. HAGENMÜLLER, H. HALLER, S. HERGET-ROSENTHAL, B. HERTENSTEIN, C. HOFMANN, M. LANG, J. T. KIELSTEIN, U. C. KLOSTERMEIER, J. KNOBLOCH, M. KUEHBACHER, U. KUNZENDORF, H. LEHNERT, M. M. P, T. F. MENNE, T. N. MEYER, C. MICHAEL, T. MÜNTE, C. NEUMANN-GRUTZECK, J. NUERNBERGER, H. PAVENSTAEDT, L. RAMAZAN, L. RENDERS, J. REPENTHIN, W. RIES, A. ROHR, L. C. RUMP, O. SAMUELSSON, F. SAYK, B. M. W. SCHMIDT, S. SCHNATTER, H. SCHÖCKLMANN, S. SCHREIBER, C. U. VON SEYDEWITZ, J. STEINHOFF, S. STRACKE, S. SUERBAUM, A. VAN DE LOO, M. VISCHEDYK, K. WEISENBORN, P. WELHÖNER, M. WIESNER, S. ZEISSIG, J. BÜNING, M. SCHIFFER und T. KUEHBACHER (2012). Validation of treatment strategies for enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 induced haemolytic uraemic syndrome: case control study. *British Medical Journal* **345**: e4565.

MIKO, A., K. PRIES, S. HABY, K. STEEGE, N. ALBRECHT, G. KRAUSE und L. BEUTIN (2009). Assessment of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Wildlife Meat as Potential Pathogens for Humans. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 6462 - 6470.

MIYASHITA, A., S. IYODA, K. ISHII, H. HAMAMOTO, K. SEKIMIZU und C. KAITO (2012). Lipopolysaccharide O-antigen of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for killing both insects and mammals. *FEMS Microbiology Letters* **333**: 59 - 68.

MONAGHAN, Á., B. BYRNE, S. FANNING, T. SWEENEY, D. McDOWELL und D. J. BOLTON (2011). Serotypes and Virulence Profiles of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Bovine Farms. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 8662 - 8668.

MONDAY, S. R., A. BEISAW und P. C. H. FENG (2007). Identification of Shiga toxigenic *Escherichia coli* seropathotypes A and B by multiplex PCR. *Molecular and Cellular Probes* **21**: 308 - 311.

MORABITO, S., H. KARCH, P. MARIANI-KURKDJIAN, H. SCHMIDT, F. MINELLI, E. BINGEN und A. CAPRIOLI (1998). Enterohemorrhagic, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O111:H2 Associated with an Outbreak of Hemolytic-Uremic Syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* **36**: 840 - 842.

MORIEL, D. G., R. ROSINI, K. L. SEIB, L. SERINO, M. PIZZA und R. RAPPUOLI (2012). *Escherichia coli*: Great Diversity around a Common Core. *mBio* **3**: e00118-00112.

MRI (2008). Nationale Verzehrsstudie II - Ergebnisbericht, Teil 2. Karlsruhe, Max Rubner-Institut über http://www.mri.bund.de/fileadmin/Institute/EV/NVSII_Abschlussbericht_Teil_2.pdf.

N.N. (2007). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* - Instructions for Authors. Zuletzt aufgerufen am 28.02.2013 über <http://www.bergeys.org/bergeysinstructions.pdf>.

N.N. (2010). NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual. Wilmington, Delaware, USA, Thermo Scientific.

N.N. (2012a). History of Nucleic Acids Isolation. Zuletzt aufgerufen am 22.02.2013 über http://www.roche-applied-science.com/sis/nucleic-acid-isolation-purification/index.jsp?id=NAP_050000.

N.N. (2012b). qPCR guide. Seraing, Belgien, Eurogentec über <http://www.eurogentec.com/uploads/qPCR-guide.pdf>.

NEWTON, H. J., J. SLOAN, D. M. BULACH, T. SEEMANN, C. C. ALLISON, M. TAUSCHEK, R. M. ROBINS-BROWNE, J. C. PATON, T. S. WHITTAM, A. W. PATON und E. L. HARTLAND (2009). Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Strains Negative for Locus of Enterocyte Effacement. *Emerging Infectious Diseases* **15**: 372 - 380.

NGUYEN, T. D., T. T. VO und H. VU-KHAC (2011). Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. *Journal of Veterinary Science* **12**: 159 - 164.

NOLAN, T., R. MUELLER und S. BUSTIN (2007). QPCR: Target Preparation. Real-Time PCR in Microbiology. I. M. MACKAY. Norfolk, UK, Caister Academic Press: 71ff.

OAKES, R. S., R. L. SIEGLER, M. A. McREYNOLDS, T. PYSHER und A. T. PAVIA (2006). Predictors of Fatality in Postdiarrheal Hemolytic Uremic Syndrome. *Pediatrics* **117**: 1656 - 1662.

OGURA, Y., T. OOKA, A. IGUCHI, H. TOH, M. ASADULGHANI, K. OSHIMA, T. KODAMA, H. ABE, K. NAKAYAMA, K. KUROKAWA, T. TOBE, M. HATTORI und T. HAYASHI (2009). Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O175 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *PNAS* **106**: 17939 - 17944.

OJO, O. E., A. T. P. AJUWAPE, E. B. OTESILE, A. A. OWOADE, M. A. OYEKUNLE und A. I. ADETOSOYE (2010). Potentially zoonotic shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in the faeces and meat of food-producing animals in Ibadan, Nigeria. *International Journal of Food Microbiology* **142**: 214 - 221.

OPORTO, B., J. I. ESTEBAN, G. ADURIZ, R. A. JUSTE und A. HURTADO (2008). *Escherichia coli* O157:H7 and Non-O157 Shiga Toxin-producing *E. coli* in Healthy Cattle, Sheep and Swine Herds in Northern Spain. *Zoonoses and Public Health* **55**: 73 - 81.

ORSKOV, I., F. ORSKOV, B. JANN und K. JANN (1977). Serology, Chemistry, and Genetics of O and K Antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriological Reviews* **41**: 667 - 710.

OSMAN, K. M., A. M. MUSTAFA, M. ELHARIRI und G. S. ABDELHAMED (2012). The Distribution of *Escherichia coli* Serovars, Virulence Genes, Gene Association and Combinations and Virulence Genes Encoding Serotypes in Pathogenic *E. coli* Recovered from Diarrhoeic Calves, Sheep and Goat. *Transboundary and Emerging Diseases*.

PATON, J. C. und A. W. PATON (1998). Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Clinical Microbiology Reviews* **11**: 450 - 479.

PAVLOVIC, M., I. HUBER, H. SKALA, R. KONRAD, H. SCHMIDT, A. SING und U. BUSCH (2010). Development of a Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains. *Foodborne Pathogens and Diseases* **7**: 801 - 808.

PEARCE, M. C., J. EVANS, I. J. McKENDRICK, A. W. SMITH, H. I. KNIGHT, D. J. MELLOR, M. E. J. WOOLHOUSE, G. J. GUNN und J. C. LOW (2006). Prevalence and Virulence Factors of *Escherichia coli* Serogroups O26, O103, O111, and O145 Shed by Cattle in Scotland. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 653 - 659.

PERELLE, S., F. DILASSER, J. GROUT und P. FACH (2004). Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Molecular and Cellular Probes* **18**: 185 - 192.

PERELLE, S., F. DILASSER, J. GROUT und P. FACH (2005). Detection of *Escherichia coli* serogroup O103 by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology* **98**: 1162 - 1168.

PERNA, N. T. (2011). Genomics of *Escherichia* and *Shigella*. *Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens*. M. WIEDMANN und W. ZHANG. New York/Heidelberg/London, Springer: 119 - 139.

PERSSON, S., K. E. P. OLSEN, S. ETHELBERG und F. SCHEUTZ (2007). Subtyping Method for *Escherichia coli* Shiga Toxin (Verocytotoxin) 2 Variants and Correlations to Clinical Manifestations. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 2020 - 2024.

PÖPPING, B. und C. UNTERBERGER (2010). Extraktion von DNA. *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik*. U. BUSCH. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.

PRADEL, N., Y. BERTIN, C. MARTIN und V. LIVRELLI (2008). Molecular Analysis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Hemolytic-Uremic Syndrome Patients and Dairy Samples in France. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 2118 - 2128.

QUINN, P. J., B. K. MARKEY, F. C. LEONARD, E. S. FITZPATRICK, S. FANNING und P. J. HARTIGAN (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Chichester, UK, Wiley-Blackwell.

RANGEL, J. M., P. H. SPARLING, C. CROWE, P. M. GRIFFIN und D. L. SWERDLOW (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982 - 2002. *Emerging Infectious Diseases* **11**: 603 - 609.

RASKO, D. A., M. J. ROSOVITZ, G. S. A. MYERS, E. F. MONGODIN, W. F. FRICKE, P. GAJER, J. CRABTREE, M. SEBAIHIA, N. R. THOMSON, R. CHAUDHURI, I. R. HENDERSON, V. SPERANDIO und J. RAVEL (2008). The Pangenome Structure of *Escherichia coli*: Comparative Genomic Analysis of *E. coli* Commensal and Pathogenic Isolates. *Journal of Bacteriology* **190**: 6881 - 6893.

REISCHL, U., M. T. YOUSSEF, J. KILWINSKI, N. LEHN, W. L. ZHANG, H. KARCH und N. A. STROCKBINE (2002). Real-Time Fluorescence PCR Assays for Detection and Characterization of Shiga Toxin, Intimin, and Enterohemolysin Genes from Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 2555 - 2565.

REMAUT, H. und G. WAKSMAN (2009). Structure, Function and Biogenesis of Pili formed by the Chaperon/Usher Pathway. Pili and Flagella. K. F. JARELL. Norfolk, UK, Caister Academic Press: 59.

RKI (2010). Robert Koch-Institut: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2009. Berlin, Robert Koch-Institut.

RKI (2011a). Robert Koch-Institut: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2010. Berlin, Robert Koch-Institut.

RKI (2011b). EHEC/HUS O104:H4 - Der Ausbruch wird als beendet betrachtet. Berlin, Robert Koch-Institut über http://www.rki.de/DE/Content/Service/Presse/Pressemitteilungen/2011/11_2011.html?nn=2370416.

RKI (2012a). Robert Koch-Institut: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2011. Berlin, Robert Koch-Institut.

RKI (2012b). Zuletzt aufgerufen am 07.10.2012 über <http://www3.rki.de/SurvStat>.

RKI (2013). Zuletzt aufgerufen am 26.02.2013 über <http://www3.rki.de/SurvStat>.

ROUNDS, J. M., C. E. RIGDON, L. J. MUHL, M. FORSTNER, G. T. DANZEISEN, B. S. KOZIOL, C. TAYLOR, B. T. SHAW, G. L. SHORT und K. E. SMITH (2012). Non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Associated with Venison. *Emerging Infectious Diseases* **18**: 279 - 282.

RUGGENENTI, P. und G. REMUZZI (2011). A German outbreak of haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet* **378**: 1057 - 1058.

RUMI, M. V., K. IRINO, N. DEZA, M. J. HUGUET und A. B. BENTANCOR (2012). First isolation in Argentina of a highly virulent Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145:NM from a domestic cat. *Journal of Infection in Developing Countries* **6**: 358 - 363.

SABARLY, V., O. BOUVET, J. GLODT, O. CLERMONT, D. SKURNIK, L. DIANCOURT, D. de VIENNE, E. DENAMUR und C. DILLMAN (2011). The decoupling between genetic structure and metabolic phenotypes in *Escherichia coli* leads to continuous phenotypic diversity. *Journal of Evolutionary Biology* **24**: 1559 - 1571.

SALDAÑA, Z., E. SÁNCHEZ, J. XICOHTENCATL-CORTES, J. L. PUENTE und J. A. GIRÓN (2011). Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7. *Frontiers in Microbiologie* **2**: Article 119. *Frontiers in Microbiology* gestattet entsprechend der Creative Commons Attribution License (CC BY) den direkten Nachdruck von Abbildungen dieses Artikels: <http://creativecommons.org/licenses/by/113.110/deed.de>.

SÁNCHEZ, S., A. GARCÍA-SÁNCHEZ, R. MARTÍNEZ, J. BLANCO, J. E. BLANCO, M. BLANCO, G. DAHBI, A. MORA, J. HERMOSO DE MENDOZA, J. M. ALONSO und J. REY (2009). Detection and characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than *Escherichia coli* O157:H7 in wild ruminants. 384-388.

SÁNCHEZ, S., R. MARTÍNEZ, A. GARCÍA, D. VIDAL, J. BLANCO, M. BLANCO, J. E. BLANCO, A. MORA, S. HERRERA-LEÓN, A. ECHEITA, J. M. ALONSO und J. REY (2010). Detection and characterisation of O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wild boars. *Veterinary Microbiology* **143**: 420 - 423.

SANDVIG, K., J. BERGAN, A.-B. DYVE, T. SKOTLAND und M. L. TORGENSEN (2010). Endocytosis and retrograde transport of Shiga toxin. *Toxicon* **56**: 1181 - 1185.

SCHAECHTER, M. (2009). *Escherichia Coli*. *The Desk Encyclopedia of Microbiology*. M. SCHAECHTER. Kidlington, UK, Academic Press (Elsevier). **2**: 422.

SCHEUTZ, F. und N. A. STROCKBINE (2005). Genus I. *Escherichia*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - The Proteobacteria - Part B The Gammaproteobacteria*. G. M. GARRITY, D. J. BRENNER, N. R. KRIEG und J. T. STALEY. New York, Springer. **2**: 607 - 624.

SCHEUTZ, F., L. D. TEEL, L. BEUTIN, D. PIÉRARD, G. BUVENS, H. KARCH, A. MELLMANN, A. CAPRIOLI, R. TOZZOLI, S. MORABITO, N. A. STROCKBINE, A. R. MELTON-CELSA, M. SANCHEZ, S. PERSSON und A. D. O'BRIEN (2012). Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* **50**: 2951-2963.

SCHLAGER, S. (2011). *E. coli*. *labor&more* **4**: 18 - 20.

SCHMIDT, H., L. BEUTIN und H. KARCH (1995). Molecular Analysis of the Plasmid-Encoded Hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 Strain EDL 933. *Infection and Immunity* **63**: 1055-1061.

SCHMIDT, H., J. SCHEEF, S. MORABITO, A. CAPRIOLI, L. H. WIELER und H. KARCH (2000). A New Shiga Toxin 2 Variant (Stx2f) from *Escherichia coli* Isolated from Pigeons. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 1205-1208.

SCHMIDT, M. A. (2010). LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cellular Microbiology* **12**: 1544 - 1552.

SCHMITT, C. K., M. L. MCKEE und A. D. O'BRIEN (1991). Two Copies of Shiga-Like Toxin II-Related Genes Common in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains Are Responsible for the Antigenic Heterogeneity of the O157:H⁻ Strain E32511. *Infection and Immunity* **59**: 1065-1073.

SCHREIBER, C. S. (2008). Genotypische und phänotypische Charakterisierung von Shigatoxin-bildenden und enterohämorrhagischen *Escherichia coli*-Isolaten von Mensch, Tier, Lebensmittel und Wasser aus Bayern im Zeitraum von 2002 bis 2006. Tierärztliche Fakultät. München, Ludwigs-Maximilians-Universität München.

SCHÜLLER, S. (2011). Shiga Toxin Interaction with Human Intestinal Epithelium. *Toxins* **3**: 626 - 639.

SILIPO, A. und A. MOLINARO (2011). Lipid A Structure. Bacterial Lipopolysaccharides - Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cells. Y. A. KNIREL und M. A. VALVANO. Wien, Springer-Verlag: 1f.

SONNTAG, A.-K., R. PRAGER, M. BIELASZEWSKA, W. ZHANG, A. FRUTH, H. TSCHÄPE und H. KARCH (2004). Phenotypic and Genotypic Analyses of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 Strains from Patients in Germany. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 954 - 962.

STÅHL, A.-I., L. SARTZ, A. NELSSON, Z. D. BÉKÁSSY und D. KARPMAN (2009). Shiga Toxin and Lipopolysaccharide induce Platelet-Leukocyte Aggregates and Tissue Factor Release, a Thrombotic Mechanism in Hemolytic Uremic Syndrome. *PLoS ONE* **4**: e6990.

STENUTZ, R., A. WEINTRAUB und G. WIDMALM (2006). The structure of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiological Reviews* **30**: 382 - 403.

STEPHENSON, F. H. (2010). Calculations for Molecular Biology and Biotechnology. Burlington, USA, Elsevier.

STIGI, K. A., K. MACDONALD, A. A. TELLEZ-MARFIN und K. H. LOFY (2012). Laboratory Practices and Incidence of Non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Infections. *Emerging Infectious Diseases* **18**: 477 - 479.

STRADAL, T. E. B. und S. BACKERT (2010). Wirt-Pathogen-Interaktion: Wie EHEC das Aktinzytoskelett der Wirtszelle beeinflussen. *Biospektrum* **06.10**: 624 - 627.

SUERBAUM, S., J. BOCKEMÜHL und H. KARCH (2009). Enterobakterien. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. H. Hahn, S. H. E. Kaufmann, T. F. Schulz und S. Suerbaum. Heidelberg, Springer. **6**: 237 ff.

TAYLOR, C. M., R. H. WHITE, M. H. WINTERBORN und B. ROWE (1986). Haemolytic-uraemic syndrome: clinical experience of an outbreak in the West Midlands. *British Medical Journal* **292**: 1513-1516.

TESH, V. L. (2012). Activation of cell stress response pathways by Shiga toxins. *Cellular Microbiology* **14**: 1 - 9.

TOUCHON, M., C. HOEDE, O. TENAILLON, V. BARBE, S. BAERISWYL, P. BIDET, E. BINGEN, S. BONACORSI, C. BOUCHIER, O. BOUVET, A. CALTEAU, H. CHIAPELLO, O. CLERMONT, S. CRUVEILLER, A. DANCHIN, M. DIARD, C. DOSSAT, M. EL KAROUI, E. FRAPY, L. GARRY, J. M. GHIGO, A. M. GILLES, J. JOHNSON, C. LE BOUGUÉNEC, M. LESCAT, S. MANGENOT, V. MARTINEZ-JÉHANNE, I. MATIC, X. NASSIF, S. OZTAS, M. A. PETIT, C. PICHON, Z. ROUY, C. S. RUF, D. SCHNEIDER, J. TOURET, B. VACHERIE, D. VALLENET, C. MÉDIGUE, E. P. C. ROCHA und E. DENAMUR (2009). Organised Genome Dynamics in the *Escherichia coli* Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths. *PLoS Genetics* **5**: e1000344.

UBA (2011). Umweltbundesamt: FAQ - EHEC. Zuletzt aufgerufen am 28.02.2013 über http://www.umweltbundesamt.de/gesundheit/publikationen/faq_ehec.pdf.

ULLMANN, U. (2012). *Escherichia coli*. Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen. G. DARAI, M. HANDERMANN, H. G. SONNTAG und L. ZÖLLER. Berlin Heidelberg, Springer. **4**: 294 - 296.

USDA (2012a). Risk Profile for Pathogenic Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (non-O157 STEC), USDA - Food Safety and Inspection Service über http://www.fsis.usda.gov/PDF/Non_O157_STEC_Risk_Profile_May2012.pdf.

USDA (2012b). Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Certain Raw Beef Products. FSIS, Federal Register. **FR 2012-13283**: 31975 - 31981.

VALENTIN-WEIGAND, P. (2011). Morphologie und Aufbau der Bakterienzelle. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. H. J. SELBITZ, U. TRUYEN und P. VALENTIN-WEIGAND. Stuttgart, Enke. **9**: 91.

VOGELSTEIN, B. und D. GILLESPIE (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **76**: 615 - 619.

VU-KHAC, H. und N. A. CORNICK (2008). Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes, cattle, and goats in central Vietnam. *Veterinary Microbiology* **126**: 356 - 363.

WADL, M., D. E. MÜLLER-WIEFEL, K. STARK, A. FRUTH, H. KARCH und D. WERBER (2010). Enteropathisches hämolytisch-urämisches Syndrom. Monatsschrift Kinderheilkunde 2011 **159**: 152 - 160.

WANG, L., H. CURD, W. QU und P. R. REEVES (1998). Sequencing of *Escherichia coli* O111 O-Antigen Gene Cluster and Identification of O111-Specific Genes. Journal of Clinical Microbiology **36**: 3182 - 3187.

WANG, L. und P. R. REEVES (2000b). The *Escherichia coli* O111 and *Salmonella enterica* O35 Gene Clusters: Gene Clusters Encoding the Same Colitose-Containing O Antigen Are Highly Conserved. Journal of Bacteriology **182**: 5256 - 5261.

WANG, Y., E. S. BJES und A. F. ESSER (2000a). Molecular Aspects of Complement-mediated Bacterial Killing. Journal of Biological Chemistry **275**: 4687 - 4692.

WEBER, H. (2010). *Escherichia coli*. Mikrobiologie der Lebensmittel - Grundlagen. H. Weber, Behr's Verlag. **9**: 255.

WEINSTEIN, D. L., M. P. JACKSON, J. E. SAMUEL, R. K. HOLMES und A. D. O'BRIEN (1988). Cloning and Sequencing of a Shiga-Like Toxin Type II Variant from an *Escherichia coli* Strain Responsible for Edema Disease of Swine. Journal of Bacteriology **170**(9): 4223-4230.

WERBER, D., L. BEUTIN, R. PICHNER, K. STARK und A. FRUTH (2008). Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Serogroups in Food and Patients, Germany. Emerging Infectious Diseases **14**: 1803 - 1806.

WHITFIELD, C. (2006). Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli*. Annu. Rev. Biochem. **75**: 39 - 68.

WHITFIELD, C. und I. S. ROBERTA (1999). Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. Molecular Microbiology **31**: 1307 - 1319.

WICHMANN-SCHAUER, H., P. HILLER, A. REINECKE, A. FETSCH, A. KÄSBOHRER, A. WEISER, A.-K. WESE, A. MIKO, J. BRÄUNIG und B. APPEL (2012). EHEC-Ausbruch 2011: Ausbruchsaufklärung entlang der Lebensmittelkette. UMID - Umwelt und Mensch-Informationsdienst **1**: 9 - 15.

WIELER, L. H., C. EWERS und H. J. SELBITZ (2011a). *Enterobacteriaceae*. Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. H. J. SELBITZ, U. TRUYEN und P. VALENTIN-WEIGAND. Stuttgart, Enke. **9**: 186.

WIELER, L. H., T. SEMMLER, I. EICHHORN, E. M. ANTAO, B. KINNEMANN, L. GEUE, H. KARCH, S. GUENTHER und A. BETHE (2011b). No evidence of the Shiga toxin-producing *E. coli* O104:H4 outbreak strain or enteroaggregative *E. coli* (EAEC) found in cattle faeces in northern Germany, the hotspot of the 2011 HUS outbreak area. Gut Pathogens: 17.

WONG, A. R. C., J. S. PEARSON, M. D. BRIGHT, D. MUNERA, K. S. ROBINSON, S. F. LEE, G. FRANKEL und E. L. HARTLAND (2011). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. *Molecular Microbiology* **80**: 1420 - 1438.

YAN, X., P. M. FRATAMICO, D. S. NEEDLEMAN und D. O. BAYLES (2012). DNA sequence and analysis of a 90.1-kb plasmid in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O145:NM 83-75. *Plasmid* **68**: 25 - 32.

ZHANG, W.-L., M. BIELASZEWSKA, A. LIESEGANG, H. TSCHÄPE, H. SCHMIDT, M. BITZAN und H. KARCH (2000). Molecular Characteristics and Epidemiological Significance of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O26 Strains. *Journal of Clinical Microbiology* **38**: 2134 - 2140.

ZHANG, W., M. BIELASZEWSKA, T. KUCZIUS und H. KARCH (2002). Identification, Characterization, and Distribution of a Shiga Toxin 1 Gene Variant (*stx_{1c}*) in *Escherichia coli* Strains Isolated from Humans. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 1441 - 1446.

ZHANG, W., A. MELLMANN, A.-K. SONNTAG, L. WIELER, M. BIELASZEWSKA, H. TSCHÄPE, H. KARCH und A. W. FRIEDRICH (2007). Structural and functional differences between disease-associated genes of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O111. *International Journal of Medical Microbiology* **297**: 17 - 26.

ZUMBRUN, S. D., L. HANSON, J. F. SINCLAIR, J. FREEDY, A. R. MELTON-CELSA, J. RODRIGUEZ-CANALES, J. C. HANSON und A. D. O'BRIEN (2010). Human Intestinal Tissue and Cultured Colonic Cells Contain Globotriaosylceramide Synthase mRNA and the Alternate Shiga Toxin Receptor Globotetraosylceramide. *Infection and Immunity* **78**: 4488 - 4499.

RECHTSVERZEICHNIS

Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Erfassung, Auswertung und Veröffentlichung von Daten über das Auftreten von Zoonosen und Zoonoseerregern entlang der Lebensmittelkette
(AVV Zoonosen Lebensmittelkette) vom 10. Februar 2012.

Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz – IfSG)
vom 20. Juli 2000 (BGBl. I S. 1045), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 28. Juli 2011 (BGBl. I S. 1622) geändert worden ist.

ISO 22118:2011 Microbiology of food and animal feeding stuffs –
Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of food-borne pathogens – Performance characteristics.

ISO 22119:2011 Microbiology of food and animal feeding stuffs –
Real-time polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – General requirements and definitions.

ISO/TS 13136:2012 Microbiology of food and animal feed –
Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens – Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups

Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch – LFGB)
in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. August 2011 (BGBl. I S. 1770), das zuletzt durch Artikel 2 des Gesetzes vom 15. März 2012 (BGBl. I S. 476) geändert worden ist.

Richtlinie 2003/99/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 17. November 2003 zur Überwachung von Zoonosen und Zoonoseerregern und zur Änderung der Entscheidung 90/424/EWG des Rates sowie zur Aufhebung der Richtlinie 92/117/EWG des Rates.

VO (EG) 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit.

Verordnung über die Qualität und die Bewirtschaftung der Badegewässer (Bayerische Badegewässerverordnung – BayBadeGewV)
vom 15. Februar 2008.

Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung – TrinkwV 2001)
in der Fassung der Bekanntmachung vom 28. November 2011 (BGBl. I S. 2370), die durch Artikel 2 Absatz 19 des Gesetzes vom 22. Dezember 2011 (BGBl. I S. 3044) geändert worden ist.

VERÖFFENTLICHUNGEN

Adam, H; Fräßdorf, J; Wolf, S; Lindermayer, M; Konrad, R; Huber, I; Märtlbauer, E und Busch, U (2011).

Etablierung einer Real-Time Multiplex-PCR zum Nachweis der *E. coli* O-Antigene O26, O103, O111, O145 und O157.

12. Fachsymposium der Fachgruppe „Lebensmittelmikrobiologie“ der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) sowie der Fachgruppe „Lebensmittelmikrobiologie“ der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM),

4. bis 6. Mai 2011, Ostseebad Damp.

Adam, H; Fräßdorf, J; Wolf, S; Lindermayer, M; Sebah, D; Maggipinto, M; Grünwald, K; Konrad, R; Huber, I, Märtlbauer, E und Busch, U (2011).

Etablierung einer Multiplex Real-Time PCR zum Nachweis der *Escherichia coli*-Serotypen O26, O103, O111, O145 und O157.

52. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG zusammen mit der Sektion Lebensmittel tierischer Herkunft in der Österreichischen Gesellschaft für Tierärzte und der Schweizerischen Tierärztlichen Vereinigung für Lebensmittelsicherheit,

27. bis 30. September 2011, Garmisch-Partenkirchen.

Adam, H; Huber, I; Konrad, R; Messelhäuser, U; Fräßdorf, J; Grünwald, K; Lindermayer, M; Maggipinto, M; Sebah, D; Wolf, S; Wudy, C; Hörmansdorfer, S; Sing, A; Busch, U (2012).

Nachweis von EHEC O104:H4 in Bayern.

Arbeitstagung 2012 der Lebensmittelchemischen Gesellschaft – Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker – Regionalverband Bayern, 6. März 2012.

Adam, H; Fräßdorf, J; Wolf, S; Lindermayer, M; Konrad, R; Huber, I; Märtlbauer, E und Busch, U (2012).

Etablierung einer Real-Time Multiplex-PCR zum Nachweis der *E. coli* Serogruppen O26, O103, O111, O145 und O157.

53. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG zusammen mit der Sektion Lebensmittel tierischer Herkunft in der Österreichischen Gesellschaft für Tierärzte und der Schweizerischen Tierärztlichen Vereinigung für Lebensmittelsicherheit,

25. bis 28. September 2012, Garmisch-Partenkirchen.

Konrad, R; Huber, I; Adam, H; Fräßdorf, J; Grünwald, K; Lindermayer, M; Maggipinto, M; Sebah, D; Wolf, S; Wudy, C; Hörmansdorfer, S; Sing, A; Busch, (2012).

Die EHEC-Diagnostik im Rahmen des öffentlichen Gesundheitsdienstes in Bayern.

DANKSAGUNG

Hier möchte ich mich nun bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben:

Besten Dank an Herrn Univ. Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die Durchsicht der Arbeit und an Dr. Heinz Becker für die kritische Überprüfung und hilfreichen Anmerkungen.

Herrn Dr. Ulrich Busch danke ich für die Ermöglichung der praktischen Arbeit am LGL, Oberschleißheim, die sofortige, sehr nette Aufnahme ins Team sowie die stets konstruktive Begleitung und Durchsicht der Arbeit.

Frau Dr. Regina Konrad gilt mein besonderer Dank für die zuverlässige Gesprächsbereitschaft, die ausführliche beratende und geduldige Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit und der statistischen Auswertung sowie die sorgfältige und unermüdliche Überprüfung der Dissertation.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Dr. Ingrid Huber, Frau Dr. Ute Messelhäuser, Marion Lindermayer, Daniela Sebah, Marzena Maggipinto, Karola Grünwald, Maren Haase, Florian Lubert und den weiteren Mitarbeitern der GE/LM für eure engagierte fachliche und praktische Beratung zu diversen Fragestellungen.

Corinna Wudy, Danke für die tolle Zusammenarbeit während des EHEC O104:H4-Ausbruchs und die schöne Zeit darüber hinaus.

Ein riesengroßes Dankeschön an Sabine Wolf und Jasmin Fräßdorf für die intensive Einarbeitung und permanente Ansprechbarkeit, die tatkräftige Hilfe bei allem und in jeder Situation und ganz besonders für die herzliche Atmosphäre im EHEC-Labor, das viele Lachen, Mittagspausen in der Sonne und die allerleckersten Kuchen.

Von Herzen Danke auch an meine Eltern, Sabine Friedrich und Markus Friedrich, die mir eine wichtige Stütze und Motivation sind und ohne deren großzügige Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Last not least ein allumfassendes Danke an Marcus, meinen Mann, für die ausdauernde, verständnis- und liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen und auch bei dieser Arbeit.